



Etude exploratoire de la synthèse des galactolipides chez *Plasmodium falciparum*

Nadia Saidani

► To cite this version:

Nadia Saidani. Etude exploratoire de la synthèse des galactolipides chez *Plasmodium falciparum*. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00339787

HAL Id: tel-00339787

<https://theses.hal.science/tel-00339787>

Submitted on 18 Nov 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier – Grenoble I

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie cellulaire

Présentée par

Nadia Saïdani

Le 05 septembre 2008

ETUDE EXPLORATOIRE DE LA SYNTHÈSE DES GALACTOLIPIDES CHEZ *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Directeurs de thèse : Éric Maréchal et Jean-François Dubremetz

Composition du Jury :

Présidente : Marie-France Cesbron-Delauw
Rapporteur : Sébastien Mongrand
Rapporteur : Ralph Schwarz
Examineur : Jean-François Dubremetz
Examineur : Eric Maréchal
Examineur : Henri Vial

Thèse préparée au sein des laboratoires
Physiologie Cellulaire Végétale du CEA de Grenoble
Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques de
l'Université Montpellier 2

Remerciements

Je remercie tout d'abord Marie-France Cesbron, directrice de recherche CNRS à l'Institut Jean Roget, d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Ralph Schwarz, professeur à l'université de Marburg et Sébastien Mongrand, chargé de recherche CNRS à l'université Bordeaux 2, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs.

Merci à Catherine Braun-Breton et Marylin Vantard, respectivement directrices des UMR5235 et UMR5168 pour l'accueil au sein de leurs laboratoires.

Combien de thésards bénéficient de trois superviseurs ? Je les remercie tous les trois pour leur encadrement et leur soutien dans le cadre de mes travaux de thèse notamment au cours des corrections (malgré les délais un peu courts) et leur appui pour « l'après-thèse » ainsi que dans un cadre plus personnel. Un très grand merci à tous les trois pour leur adaptation aux contraintes imposées par l'imprévu.

Merci à Eric Maréchal (le chef), mon directeur de thèse et porteur du projet. Pour sa gentillesse, son entrain permanent, sa capacité à prendre énormément sur lui et simplement ses qualités humaines, qui ont fait de cette thèse, gérée souvent à distance, un réel plaisir. J'ai apprécié la liberté et l'autonomie qu'il m'a laissées dans ce travail, en me recadrant parfois, en me soutenant toujours. J'ai admiré son efficacité, sa résistance, la finesse de ses propos et son écoute.

Merci à Jean-François (le maître) pour ses enseignements toujours riches, souvent impressionnants et sa rigueur en matière de recherche ; mais surtout pour sa gentillesse qui n'a d'égale que sa patience.

Je remercie de tout cœur Henri Vial (le boss), ancien directeur de l'UMR5539, qui m'a accueillie au laboratoire, tant pour son soutien que sa confiance indéfectibles avant la réalisation de cette thèse, pendant la réalisation de cette thèse, ainsi que lors de la préparation des suites de celle-ci. Son appui, ses conseils avisés et ses critiques constructives ont été un moteur.

Cette thèse aura été un confortable exutoire et le laboratoire, mes encadrants et les personnes rencontrées au cours de celle-ci ont participé à l'élaboration d'un environnement chaleureux et protecteur par leur aide et leur soutien quotidiens.

Alors un grand merci à tous les membres de l'UMR5539 et 5235... pour les rires, les sourires, les fous rires, les combats improvisés, les bras de fer perdus et gagnés, les soutiens sportifs et challenges en équipe, les balades sur l'eau, les confidences en atmosphère dépressurisée, les discussions d'autoclave, de couloirs, et d'escaliers, les délires bretons, les partages musicaux, littéraires en tous genres, les séances de dessin, les cinémas sous les étoiles, la montée des marches à Cannes, les ateliers barbecue et cuisine du monde, apéros décalés et dégustations en tous genres, les conversations en toutes langues, les batailles épicières et discussions passionnées, les nuits riches en rebondissements, les énergies mobilisées sur des opérations secrètes de toute première importance, les virées en voiture, les critiques constructives, les conseils et aides précieuses, les répétitions improvisées autour de gâteaux, les soirées arrosées, et au bébé qui voulait naître dans ma voiture un 17 février!

Merci aussi aux Grenoblois des UMR 5168 au CEA et 5163 à l'Institut Jean Roget pour leur accueil toujours chaleureux. Merci en particulier à Amélie, Cyrille, Delphine, Emmanuelle, Juliette, Maryse et Olivier. Les événements vécus en commun m'ont donné le sentiment de faire partie de deux équipes à la fois.

Merci à mes amis (liégeois, hamburgers et düsseldorfer, nantais, marseillais, parisiens, toulousains, millavois, bonnychons, montpelliérains voire judokas) pour leur soutien. Un énorme merci à ma famille dont la fierté et l'amour (tous deux aveugles) m'honorent. Et, forcément, merci à Gautier...

Abréviations

A	Adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ACCase	Complexe Acétyl-Coenzyme A Carboxylase
ACAT	Acétyl-CoenzymeA:ACP-transacylase
ACP	Acyl Carrier Protein
ADP	Adénosine diphosphate
AGPAT	acyl-CoA:1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase
AP	Acide phosphatidique
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
CDP	cytidine diphosphate
CCT	CTP:phosphocholine cytidylyl transférase
CK	choline kinase
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CoA	Coenzyme A
CPT	phosphotransférase
CRT	Chloroquine Resistant Transporter
DAG	Diacylglycérol
DGAT	acyl-CoA:DAG acyltransferase
DGLE	Digalactolipid-like epitope
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPS	Dihydroptéroate synthase
DPG	Diphosphatidylglycérol
DOXP	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECT	CTP:phosphoéthanolamine cytidylyl transférase
EFS	Etablissement Français du Sang
EK	Ethanolamine kinase
ENR	Enoyl-ACP reductase
EPT	Ethanolamine phosphotransférase
FabF/B	β -kétacylACPsynthase I/II
FabH	β -kétacylACPsynthase III
FAS	Fatty Acid Synthase
GPAT	Acyl-CoA:glycérol-3-phosphate acyltransférase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAD	β -Hydroxyacyl-ACP Reductase
IP₃	Inositol triphosphate
KAR	β -Ketoacyl-ACP Reductase
KAS	β -kétacylACPsynthase
kb	Kilobase
lysoPAF	Facteur d'activation plaquettaire
lyso-AP	Acide lysophosphatidique
lyso-PC	Lyso-Phosphatidylcholine
MAP	Malaria Atlas Project
MCAT	Malonyl-coenzymeA:ACP-transacylase
MGAT	Acyl-CoA:monoacylglycérol acyltransférase

Mb	Megabases
mdr	Multi-drug resistance
MGCB	Monogalactosylcérébroside
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
MMV	Medecine for Malaria Venture
MTRAP	Merozoite Thrombospondin Related Anonymous Protein
PAP	Acide phosphatidique phosphatase
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEP	Phosphoénolpyruvate
PSD	Phosphatidylsérine décarboxylase
PEMT	Phosphoéthanolamine N-méthyltransférase : Pf
PI	Phosphatidylinositol
PIP2	PI-4,5biphosphate
PS	Phosphatidylsérine
Rap	Rhoptry associated Protein
RE	Réseau tubulo-vésiculaire
RTV	réseau tubulo-vésiculaire
SM	sphingomyéline
SP	peptide signal
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TAG	triacylglycérols
UDP	Uridine Diphosphate
UMP	Uridine Monophosphate

Sommaire

Introduction	1
 I. Bref historique du paludisme	 1
 II. <i>Plasmodium</i>, parasite hématozoaire du paludisme	 2
A. Systématique de <i>Plasmodium</i> et des Apicomplexes	2
B. Cycle parasitaire de <i>Plasmodium falciparum</i>	5
 III. État du paludisme dans le monde	 7
 IV. Lutte contre le paludisme	 8
A. Programmes intégrant divers niveaux d'interventions, de la recherche scientifique pour de nouveaux traitements, aux pratiques médicales et aux politiques de prévention	8
B. La recherche de nouvelles cibles biologiques, à l'aide des approches post-génomiques	9
C. La chimiothérapie du paludisme	10
1. Les quinoléines	10
a) Les 4-aminoquinolines	11
b) Les aryl-amino-alcools	11
c) Les 8-Aminoquinolines	11
2. Les antifolates	12
a) Les antifoliques	12
b) Les antifoliniques	12
3. Les naphtoquinones	12
4. Les dérivés d'artémisinine	12
5. Les antibiotiques	13
6. Molécules en développement	13
 V. L'apicoplaste	 15

VI. La synthèse des galactolipides chloroplastiques, une cible pour des herbicides antipaludiques ? 17

Données bibliographiques 19

I. *Plasmodium falciparum* : une compartimentation membranaire à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule parasitaire 19

A. Compartimentation subcellulaire de *Plasmodium falciparum* 20

1. Le système endomembranaire 20

a) Schéma général chez les eucaryotes 20

b) Spécificité du système endomembranaire chez *Plasmodium falciparum* 22

2. Les membranes des organites semi-autonomes 25

a) L'enveloppe mitochondriale 25

b) Les membranes limitant l'apicoplaste 26

B. Le globule rouge infecté : une compartimentation membranaire induite 27

1. La membrane plasmique érythrocytaire 27

2. La vacuole parasitophore 28

3. Le réseau tubulo-vésiculaire 28

4. Les structures de Maurer 28

C. Dynamique membranaire au cours du cycle parasitaire érythrocytaire 28

1. Au cours de l'invasion 28

2. Au cours du développement en stade anneau 31

3. Au cours du développement en stade trophozoïte 31

4. Au cours du développement au stade schizonte 32

5. Au cours du développement au stade gamétocyte 32

D. Composition lipidique des membranes de *Plasmodium falciparum* 33

II. Synthèse et dynamique des acyl-lipides chez <i>Plasmodium falciparum</i>	34
A. Synthèse des acyls-lipides	35
1. Synthèse des acides gras	35
a) Définition et nomenclature	35
b) Biosynthèse des acides gras	37
2. Synthèse des glycérolipides	40
a) Définition et nomenclature	40
b) Les précurseurs des glycérolipides membranaires	41
c) Synthèse de triacylglycérol	43
d) Synthèse des phosphoglycérolipides	44
e) Synthèse des glycéroglycolipides	45
3. Synthèse des sphingolipides	47
B. Trafic des lipides chez <i>Plasmodium falciparum</i>	50
1. Trafic des acyl-lipides	50
2. Trafic des lipides, trafic des protéines et biogenèse des compartiments membranaires chez <i>Plasmodium falciparum</i>	51
C. Métabolisme et dynamique des lipides comme cible de traitements antipaludiques	54
 Matériel et Méthodes	 57
 I. Matériels biologiques	 57
A. Culture <i>in vitro</i> de modèles de parasites Apicomplexes	57
1. Culture <i>in vitro</i> de stades érythrocytaires asexués de <i>Plasmodium falciparum</i>	57
2. Préparation de cultures enrichies en gamétocytes de <i>Plasmodium falciparum</i>	57
3. Culture <i>in vitro</i> de <i>Babesia divergens</i>	58
4. Culture <i>in vitro</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	58
B. Culture <i>in vitro</i> de lignées cellulaires humaines	59

II. Méthodes d'observations par microscopie à épifluorescence	59
A. Traitement d'échantillons cellulaires pour une visualisation d'épitopes par immunofluorescence indirecte	59
B. Traitement d'échantillons cellulaires pour une visualisation de l'ADN par le réactif de Hoechst	60
C. Observation des structures cellulaires après traitements pour immunomarquage, marquage de l'ADN et/ou marquage des mitochondries	60
III. Méthodes de biologie moléculaire	61
A. Plasmides utilisés	61
B. Extraction d'ADN génomique de <i>Plasmodium falciparum</i>	62
C. Amplification de fragments d'ADN par PCR	62
D. Expression épisomale de vecteurs Multisite Gateway	63
1. Surexpression épisomale du transporteur d'UDP-galactose de <i>Plasmodium falciparum</i>	63
2. Expression épisomale de MGDG synthase exogène	64
E. Génération de Knock Out du transporteur d'UDP-Galactose de <i>Plasmodium falciparum</i> par interruption de cadres de lectures de gènes	64
F. Transfection chez <i>Plasmodium falciparum</i>	65
G. Cycles de sélection	66
H. Clonage en plaque 96 puits	66
I. Vérification de l'expression des protéines par technique d'immunomarquage (Western Blot)	67
IV. Méthodes de mesures de l'activité de molécules sur différents systèmes biologiques	67
A. Principe : la CI50, mesure de l'activité d'une molécule sur un système biologique	67
1. Définition de la bioactivité et de la CI50	67
2. Différentes CI50 mesurées dans cette étude	69
B. Mesures de l'inhibition de l'activité enzymatique des MGDG synthases de plantes mesurée <i>in vitro</i>	70
C. Mesure de l'activité antimycobactérienne <i>in vitro</i>	71
D. Mesures de l'activité antipaludique <i>in vitro</i>	71

1. Détermination de l'activité antipaludique sur des cultures asynchrones, suivant le test de Desjardins	71
2. Détermination de l'activité antipaludique en fonction du stade parasitaire	72
E. Mesure de la cytotoxicité sur cellules humaines <i>in vitro</i>	73
V. Méthode de fractionnement de protéines sur matrice d'affinité	73
A. Principe général	73
B. Préparation de la matrice d'affinité	74
C. Préparation des échantillons biologiques	74
D. Chargement des échantillons sur la matrice d'affinité	75
VI. Méthode d'analyse des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes	75
A. Préparation des échantillons de protéines	75
B. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	75
1. Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes	75
2. Coloration des protéines au bleu de Coomassie	76
VII. Méthode de microséquençage de protéines par spectrométrie de masse	76
VIII. Méthodes d'analyse des lipides	76
A. Marquage de lipides à l'UDP-[¹⁴ C]galactose	77
B. Extraction des lipides	77
C. Séparation des lipides par chromatographie sur couche mince unidimensionnelle	77
IX. Méthodes chemoinformatiques de modélisation et de comparaison structurales de petites molécules	78

Résultats – Chapitre 1 :

« Recherche de structures moléculaires analogues aux lipides chloroplastiques et homologues des protéines impliquées dans leur synthèse et dynamique chez *Plasmodium falciparum* et d'autres modèles Apicomplexes. » 81

I. Caractérisation d'un épitope de structure proche des digalactolipides chez les Apicomplexes de la sous-classe des *Haemosporidea* 82

- A. Étude de la localisation subcellulaire du DGLE chez le parasite Apicomplexe *Plasmodium falciparum* au cours de la phase érythrocytaire du cycle parasitaire 82
- B. Étude de la localisation du DGLE chez la forme invasive de *Plasmodium berghei* produite par l'Anophèle 87
- C. Étude comparative en immunofluorescence indirecte chez d'autres groupes d'Apicomplexes 87
 - 1. *Babesia divergens* (Haemosporidae) 87
 - 2. *Toxoplasma gondii* (Coccidia) 88

II. Identification et analyse sommaire d'un transporteur d'UDP-galactose putatif, protéine potentiellement nécessaire à la synthèse de galactolipides chez *P. falciparum*, 92

- A. Identification d'un gène codant pour un transporteur putatif d'UDP-galactose par analyses bioinformatiques 92
- B. Constructions génétiques pour l'expression stable ou l'invalidation par knock out du gène PF11_0141 chez *P. falciparum* 93
 - 1. Surexpression épisomale stable d'un transgène codant pour une fusion du transporteur putatif d'UDP-galactose et de la protéine fluorescente GFP. 93
 - 2. Invalidation du gène codant pour le transporteur putatif d'UDP-galactose chez *P. falciparum* par knock out 94
- C. Contrôle de l'expression 95

III. Expression exogène d'un gène codant pour une MGDG synthase de plante chez *P. falciparum* 95

- A. Construction génétique pour l'expression d'une fusion d'une séquence d'adressage apicoplastique, de la forme mature de la 96

MGDG synthase 1 d'épinard et d'une protéine fluorescente GFP chez <i>P. falciparum</i>	
B. Contrôle de l'expression	98
 Résultats – Chapitre 2 :	
« Caractérisation et optimisation de composés antipaludiques candidats, dérivés d'inhibiteurs de la synthèse de galactolipides chloroplastiques de plantes »	103
 I. Criblage pharmacologique visant à sélectionner des molécules inhibitrices de la MGDG synthase 1 d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	103
A. Stratégie de criblage	103
1. Expression inducible d'une forme recombinante de la MGDG synthase 1 d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	105
2. Mise au point d'un test miniaturisé permettant la mesure automatisée de l'activité MGDG synthase et de son inhibition	105
3. Criblage automatisé à haut débit en microplaque	106
B. Criblage de la chimiothèque : identification de deux molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1	106
 II. Caractérisation enzymologique de l'inhibition des MGDG synthases par A1B1C1_1 et A1B1C2_1, deux molécules initiales sélectionnées par criblage à haut débit	109
A. Spectre d'inhibition des molécules sur l'activité des MGDG synthases de plantes supérieures	109
B. Caractérisation de l'inhibition de A1B1C2_1 sur atMGD1 et soMGD1	110
C. Étude de l'analogie structurale de A1B1C2_1 avec le diacylglycérol	113
 III. Étude de l'activité des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1, sur la prolifération de parasites Apicomplexes et de cellules humaines <i>in vitro</i>	117
A. Effets des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération des stades érythrocytaires de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i> , en	117

cultures asynchrones

- B. Effets des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération de *Plasmodium falciparum in vitro*, en fonction des stades érythrocytaires 119
- C. Effets des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération de lignées cellulaires humaines *in vitro* 120
- D. Effets des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération d'autres modèles de parasites Apicomplexes 121

IV. Optimisation des molécules en vue d'améliorer les propriétés herbicides et/ou anti-parasitaires, discussion et perspectives 122

- A. Optimisation des propriétés herbicides et / ou anti-parasitaires de composés dérivés du châssis moléculaire commun à A1B1C1_1 et A1B1C2_1 123
- B. Caractérisation d'une série de composés ayant des propriétés anti-parasitaires intéressantes 125
 - 1. Choix des composés 125
 - 2. Détermination de la CI50 sur 96 heures de cultures mixtes de *Plasmodium falciparum* 125
- C. Recherche de la cible 126

Conclusion 135

Références Bibliographiques 141

Annexes 153

Introduction

I. Bref historique du paludisme

Les premières traces attestées du paludisme¹ (appelé aussi malaria²), ont été relevées sur des momies égyptiennes datant de plus de 5200 ans. Sur certaines d'entre elles, la présence d'ADN de *Plasmodium* a en effet été détectée *a posteriori*. Les signes cliniques du paludisme ont, pour leur part, été décrits dès l'antiquité dans certains traités égyptiens, tel le papyrus d'Ebers³ (Ebers and Stern, 1875), dont l'origine est estimée à 1550 avant notre ère. La sémiologie du paludisme, en particulier les fièvres, a également été décrite chez des patients au IV^{ème} siècle avant notre ère par le médecin helléniste Hippocrate dans « le livre des Épidémies » et « la Consultation ».

En 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, médecin officier de l'armée française, mobilisé dans la région de Constantine en Algérie, remarque la présence systématique d'un parasite dans le sang des individus atteints de fièvre palustre (ou fièvre des marais) et son absence dans le sang des personnes en bonne santé ou souffrant d'autres maladies. Il observe aussi que ce parasite disparaît suite à l'administration de quinine. Ceci le conduit à identifier et décrire le parasite responsable du paludisme (Laveran, 1881). Le parasite sera nommé *Oscillaria malariae* par Laveran lui-même. Il sera ensuite dénommé comme l'hématozoaire ou germe de Laveran. En 1885, les chercheurs italiens Marchiafava et Celli, malgré leurs premières réticences confirment finalement les travaux de Laveran par l'observation et la description (grâce à un objectif à immersion d'huile) d'un organisme amiboïde responsable des fièvres des marais, qu'ils nomment *Plasmodium*, terme actuellement utilisé pour désigner le parasite. Golgi, en 1886 puis Marchiafava et Celli en 1889 décrivent 3 des 5 espèces de *Plasmodium* endémiques pour l'homme.

L'identification à la fin du XIX^{ème} siècle du vecteur du paludisme, le moustique anophèle, est l'œuvre de Sir Ronald Ross, médecin officier britannique en poste en Inde. En 1897, celui-ci dissèque des moustiques nourris avec le sang infecté de patients atteints de paludisme (Ross, 1897). Il observe clairement différentes formes de développement du parasite chez le moustique : les oocystes sur la paroi de l'estomac, larguant les sporozoïtes, ainsi que la présence de sporozoïtes au niveau des glandes salivaires.

Les zoologistes italiens Grassi, Bastianelli et Bignami découvrent ensuite le rôle exact du moustique femelle anophèle suite à l'infection d'individus volontaires sains avec des moustiques prélevés dans des zones impaludées. Ils décrivent le cycle complet de développement de *Plasmodium* chez l'anophèle en 1899.

Les découvertes de Ronald Ross lui valent le prix Nobel de médecine en 1902. Laveran, pour sa part, sera récompensé pour l'ensemble de ses travaux sur les protozoaires par le prix Nobel de médecine en 1907.

¹du latin *palus*, *paludis* qui signifie marais

²de l'italien *mala aria* ou mauvais air

³c'est le plus ancien document médical conservé

II. *Plasmodium*, parasite hématozoaire du paludisme

L'agent responsable du paludisme est un parasite protiste du phylum des Apicomplexes et du genre *Plasmodium*. Cinq espèces sont naturellement infectieuses pour l'homme :

1. *Plasmodium falciparum* responsable de la forme la plus grave de la maladie, souvent mortelle, présent dans les régions équatoriales et subtropicales.
2. *Plasmodium vivax*, largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, pouvant causer des accès de reviviscence pendant 3 à 4 ans.
3. *Plasmodium ovale*, présent en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest, ainsi que dans certaines régions du Pacifique (principalement présent dans les zones endémiques où *P. vivax* est absent), pouvant lui aussi causer des accès de reviviscence pendant 5 ans.
4. *Plasmodium malariae*, dont la répartition géographique est dispersée et provoquant des accès palustres récurrents très tardifs qui peuvent avoir lieu jusqu'à 20 ans après l'infection originelle.
5. *Plasmodium knowlesi*, dont les infections chez l'humain ont jusqu'à récemment été attribuées par erreur à *Plasmodium malariae* ([Singh et al., 2004](#)).

A. Systématique de *Plasmodium* et des Apicomplexes

Le phylum des Apicomplexes est un embranchement du règne des protistes. Ce phylum contient plusieurs milliers d'espèces parasites unicellulaires, parmi lesquelles un grand nombre sont des agents pathogènes majeurs tant en médecine humaine que vétérinaire. Les caractéristiques communes à ce groupe sont l'existence d'une phase de sporogonie lors du cycle cellulaire ainsi que la présence d'un complexe apical. La sporogonie est un mode de reproduction asexuée de sporozoïtes à partir d'un zygote diploïde par méioses successives. Le complexe apical regroupe un ensemble d'organites spécialisés (rhoptries, granules denses et micronèmes) indispensables au mécanisme d'invasion. Le phylum des Apicomplexes regroupe par exemple les parasites des genres *Plasmodium* (agent du paludisme), *Babesia* (agent de la babésiose ou piroplasmose), *Eimeria* (agent de la coccidiose des ovins et des oiseaux), *Theileria* (agent de la theileriose), *Cryptosporidium* (agent de la cryptosporidiose, transmissible à l'homme), *Toxoplasma* (agent de la toxoplasmose) et *Neospora* (agent de la néosporose).

La classification phylogénétique fine des protistes en général et des Apicomplexes en particulier est difficile à établir et a fait l'objet de nombreuses révisions, reflet des polémiques qui ont animé l'évolution des classifications. La révision la plus récente de la classification des Apicomplexes au sein des eucaryotes par la Society of Protozoologists (société internationale de scientifiques dont la recherche porte sur les eucaryotes unicellulaires ou protistes) ([Adl et al., 2005](#)) tient compte des avancées de la recherche fondamentale (approche morphologique, étude des voies de synthèse biochimiques, phylogénétique moléculaire) accomplies depuis la dernière version ([Levine et al., 1980](#)). Dans cette classification, le terme retenu pour désigner les eucaryotes au niveau d'organisation unicellulaire est le terme « protiste » et les Apicomplexes (dont *Plasmodium*) appartiennent (avec les Ciliés et Dinoflagellés) au rang des Alveolés, qui, lui-même constitue avec les Stramenopiles, les Haptophytes et les Cryptophycées le super-groupe des Chromalveolés.

Cette classification s'inscrit en accord avec la synthèse des relations entre les règnes du vivant proposée par Cavalier-Smith en 2004 (Figure 1) d'une part et la synthèse de l'organisation des règnes eucaryotes proposée par Simpson et Roger la même année (Figure 2) d'autre part. La première (Cavalier-Smith, 2004) repose sur une classification du vivant en six règnes, dont un règne procaryote qui regroupe Negibactéries (phyla des Eobactéries, Sphingobactéries, Spirochètes, Protéobactéries, Planctobactéries et Cyanobactéries) et Unibactéries (phyla des Posibactéries et Archaeobactéries), et cinq règnes eucaryotes (protozoaires, animaux, champignons, plantes et chromistes). Un scénario établissant les relations entre ces six règnes a été proposé. Les protozoaires (composés des quatre groupes que sont les Alveolés, Cabozoa, Amibes et Choanoflagellés et du phylum des Apusozoa) relèvent à la fois d'Unicontes (issus d'une cellule eucaryote ancestrale uniciliée) et de Bicontes (issus d'une cellule eucaryote ancestrale biciliée).

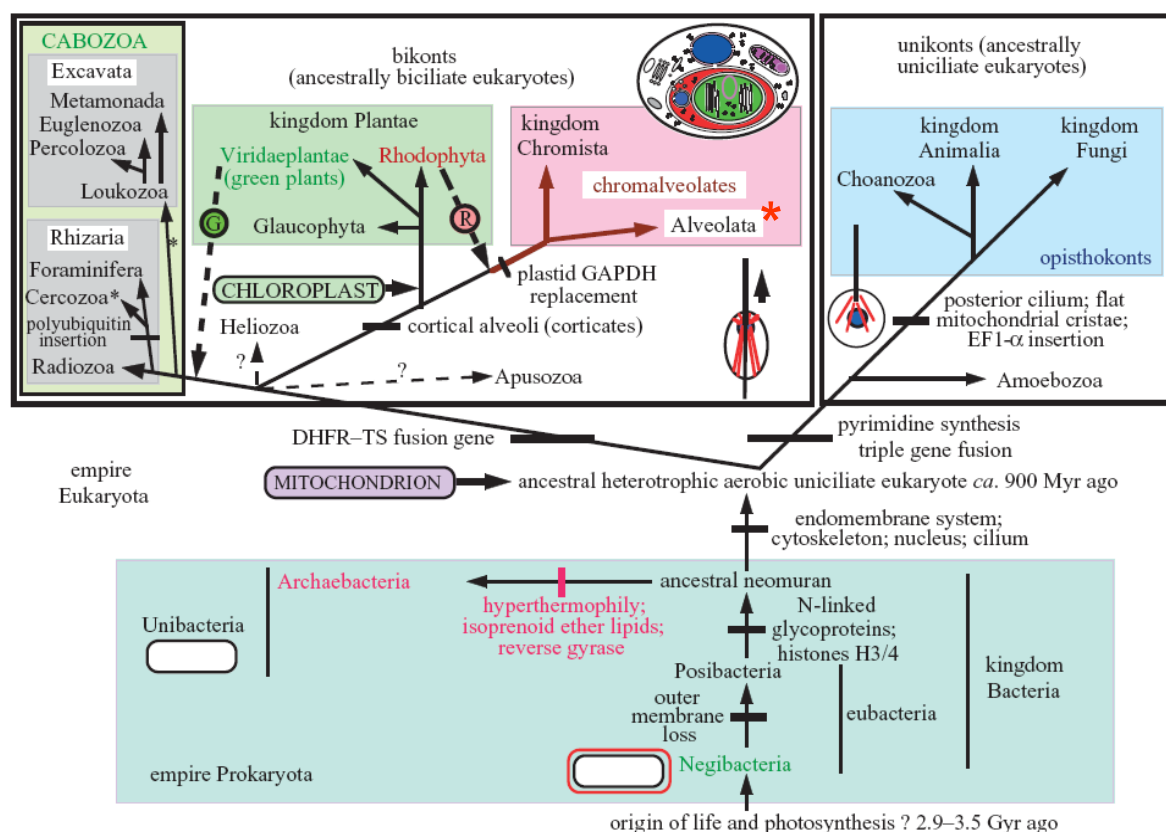


Figure 1 : L'arbre de vie selon Cavalier-Smith. Ce scénario établit les relations phylogéniques hypothétiques entre les six règnes distincts (procaryotes, protozoaires, animaux, champignons, plantes et chromistes) selon des bases moléculaires, ultra-structurales et paléontologiques. Une solution à la racine du vivant est proposée au niveau des Negibactéries tandis que celle des eucaryotes est proposée au lien ancestral entre Bicontes et Unicontes (Cavalier-Smith, 2004). Le signe (*) indique le groupe dans lequel les Apicomplexes sont classés (dans le groupe des Alveolés).

Dans cette représentation, la racine des eucaryotes se situerait au niveau du lien ancestral entre Bicontes et Unicontes. Ce scénario repose sur des données moléculaires, ultra-structurales et paléontologiques. Il tient notamment compte des théories endosymbiotiques (1) de l'origine de la mitochondrie et du chloroplaste (acquis lors de l'ingestion de Negibactéries distinctes par un

eucaryote primitif), (2) de l'origine des Chromalveolés par ingestion d'une algue rouge unicellulaire par un eucaryote unicellulaire.

La seconde (Simpson and Roger, 2004) repose sur une division des eucaryotes en six groupes majeurs : Opisthokontes, Amibes, Plantes, Excavata (groupe auquel appartiennent notamment les Trypanosomatidés), Rhizaria (groupe auquel appartiennent notamment les Foraminifères et Chlorarachniophytes) et Chromalveolés (groupe dans lequel se situent les Apicomplexes) (Figure 2). Dans cette représentation, les questions des relations exactes entre ces six groupes ainsi que la position de la racine des eucaryotes ne sont pas résolues.

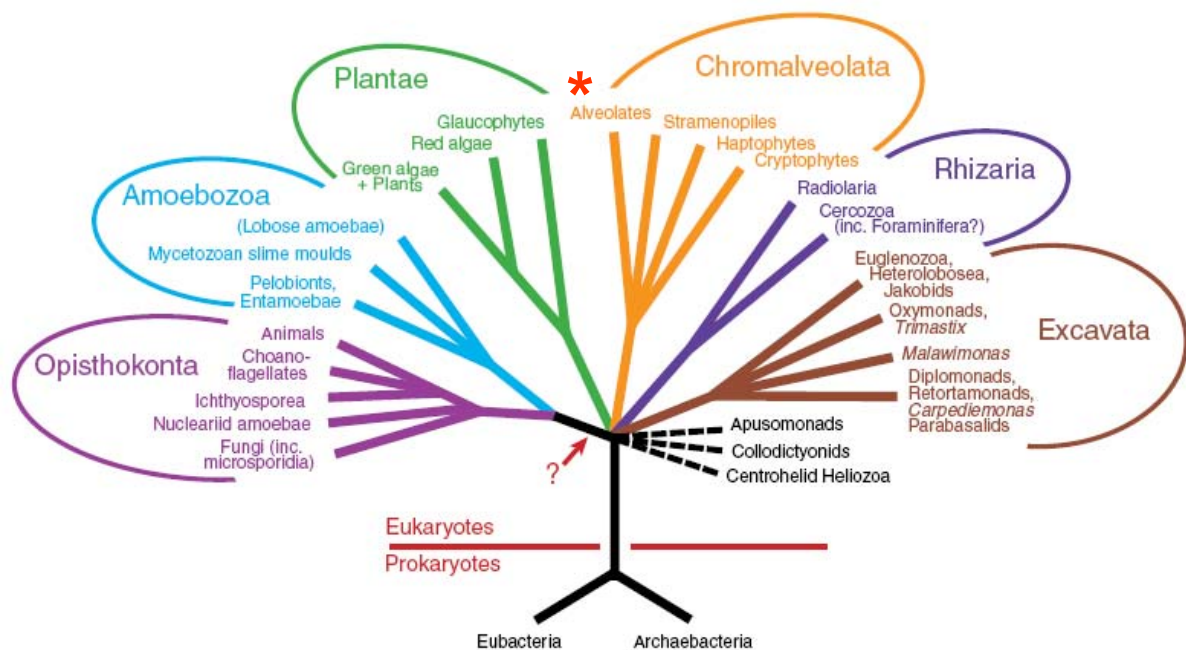


Figure 2 : Arbre représentant l'organisation des eucaryotes en six règnes. La classification repose sur les informations collectées grâce aux avancées des méthodes analytiques en phylogénétique moléculaire. Les relations exactes entre les six groupes et la position exacte de la racine de l'arbre demeurent non résolues. La flèche indique la position hypothétique de la racine (Simpson and Roger, 2004). Le signe (*) indique le groupe dans lequel les Apicomplexes sont classés (dans le groupe des Alveolés).

Dans la nouvelle classification *Plasmodium* peut être plus précisément défini comme: un Apicomplexa Aconoidasida (conoïde absent du complexe apical au cours des stades asexués) Haemosporida (ookinète mobile contenant un conoïde, sporozoïtes produits par schizogonie) (Adl et al., 2005).

B. Cycle parasitaire de *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum est un parasite hétéroxène⁴ à deux hôtes : un moustique hématophage femelle du genre *Anopheles* et l'Humain. Le développement du parasite est en partie sexué (fécondation suivie d'une sporogonie asexuée) chez le moustique, asexué (schizogonie) chez l'Humain, chez qui le développement parasitaire se décompose en une phase exoérythrocytaire hépatique et une phase érythrocytaire.

La transmission vectorielle du parasite (sous forme de sporozoïtes) à l'Humain s'effectue via la piqûre d'un moustique femelle infectieux (porteur de sporozoïtes au sein de ses glandes salivaires) lors d'un repas sanguin, au cours duquel le moustique va régurgiter plusieurs dizaines de parasites (les sporozoïtes présents dans ses glandes salivaires) (Figure 3).

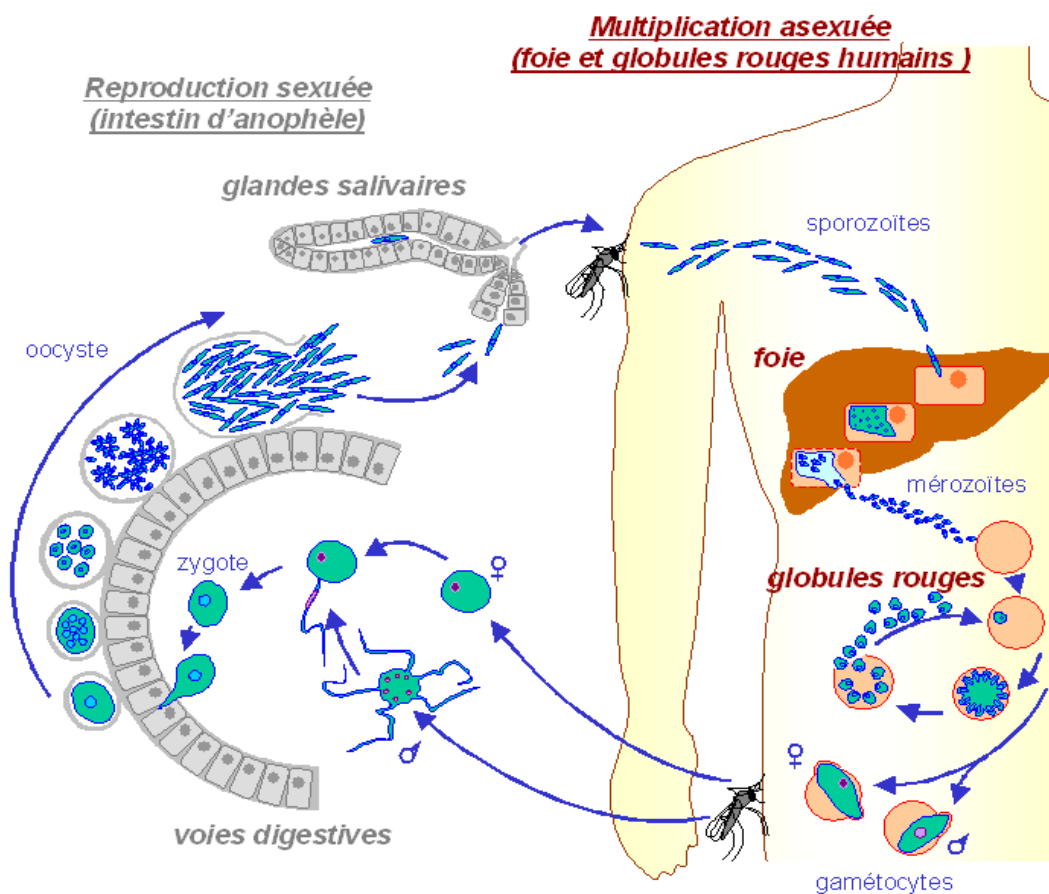


Figure 3 : Cycle de *Plasmodium falciparum*. La transmission du parasite de l'anophèle s'effectue au cours du repas sanguin d'un moustique à l'homme. Le parasite subira un premier cycle de divisions au sein des cellules hépatiques (schizogonies exoérythrocytaires) puis un cycle de divisions au sein des globules rouges (schizogonies érythrocytaires). Au cours de son développement érythrocytaire, certains parasites se différencient en gamétocytes, qui évolueront en gamètes chez le moustique après ingestion.

Les sporozoïtes atteignent rapidement le foie humain par la circulation sanguine ; ils y subissent une suite de multiplications asexuées appelées schizogonies exoérythrocytaires. À l'issue

⁴ qui alterne entre plusieurs hôtes au cours de son développement

de ces divisions (7 à 10 jours) et après éclatement des hépatocytes infectés, de nombreux mérozoïtes (plusieurs milliers par hépatocyte) capables d'infecter les globules rouges sont relargués pour une nouvelle série de schizogonies érythrocytaires.

Des formes dormantes des parasites *P. vivax* et *P. ovale*, appelées hypnozoïtes, peuvent cependant persister au sein des hépatocytes. Leur réactivation provoque des rechutes qui peuvent avoir lieu plusieurs mois à plusieurs années après infection.

Le parasite prend trois formes distinctes successives au cours de son cycle de développement érythrocytaire (48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72 heures pour *P. malariae*) : d'abord le stade anneau, puis le stade trophozoïte pendant lequel le parasite synthétise ses macromolécules, dégrade l'hémoglobine et synthétise un pigment, l'hémozoïne et le stade schizonte, plurinucléé, qui, observé en microscopie optique, laisse apparaître la différenciation des futurs mérozoïtes (Figure 4). Une description des différents stades érythrocytaires est détaillée dans le chapitre [Données Bibliographiques](#).

Au cours du cycle érythrocytaire du parasite, l'éclatement des globules rouges libérant les mérozoïtes infectieux provoque des accès plus ou moins réguliers de fièvres (en fonction de l'espèce de parasite).

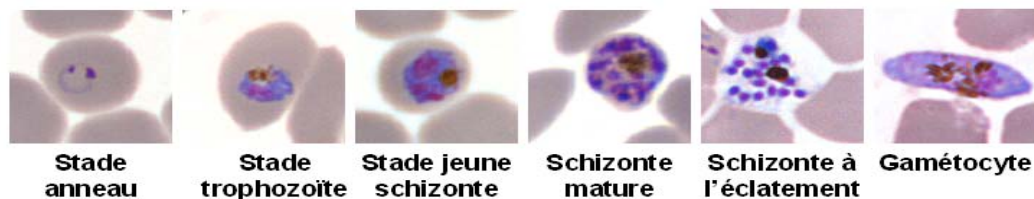


Figure 4 : Stades érythrocytaires du parasite *Plasmodium falciparum*. Frottis sanguin (étalement mince) effectué sur culture de lignée clonale 3D7 de *P. falciparum*, observé après fixation au méthanol puis coloration de Romanovsky-Giemsa. On peut différencier les principaux stades érythrocytaires : stades anneau, trophozoïte, jeune schizonte plurinucléé, schizonte mature, schizonte à l'éclatement du globule rouge, libérant ses mérozoïtes et gamétocyte.

Au cours de leur développement au sein des érythrocytes, certains parasites se différencient en gamétocytes : macrogamétocyte (femelle) et microgamétocyte (mâle). Ces gamétocytes ne poursuivent leur développement en gamètes que s'ils sont ingérés au cours d'un repas sanguin de l'anophèle femelle. Cette évolution en gamète s'effectue dans la lumière de l'estomac de l'anophèle sous l'action combinée d'une baisse de température, de l'augmentation de pH, et de la présence d'acide xanthurénique par un processus de division et d'exflagellation qui aboutit à la libération de huit gamètes mâles (Billker *et al.*, 2000). La fécondation conduit à un zygote mobile (ookinète), diploïde, qui va subir une méiose, puis à un oocyste implanté dans l'épithélium de la paroi stomacale de l'insecte. Cet oocyste produit alors des sporozoïtes par sporogonies successives. Ceux-ci migrent vers les glandes salivaires du moustique et sont aptes à infecter de nouveaux individus (Figure 3).

Toutes les espèces d'anophèles ne sont pas vectrices du paludisme humain. Les plus importantes sont *Anopheles gambiae* en Afrique, *Anopheles darlingi* en Amérique du Sud, *Anopheles stephensi* en Asie.

Grâce à des prélèvements sanguins dans lesquels ils peuvent se propager, ces stades peuvent être maintenus en culture continue *in vitro* selon la méthode de Trager et Jensen (Trager and Jensen, 1976). Avant cette avancée technique décisive, les études fondamentales étaient dépendantes de paludismes contrôlés, développés sur des modèles animaux maintenus en animalerie, notamment de primates (*Plasmodium knowlesi*) ou de rongeurs (*Plasmodium berghei*, *vinckei*, *chabaudi* ou *yoelii*). La prolifération *in vitro* des formes érythrocytaires permet en particulier de valider des protocoles d'études fondamentales structurales ou d'études préliminaires d'effets de molécules sur le parasite.

III. État du paludisme dans le monde

Endémique⁵ dans 107 pays des régions tropicales et subtropicales (Figure 5), le paludisme cause chaque année de 300 à plus de 500 millions de cas cliniques et 1,5 à 2,7 millions de morts dans le monde (OMS, 2005), notamment parmi les populations à risque que constituent les femmes enceintes, les enfants de moins de cinq ans et les individus immunodéprimés, particulièrement en Afrique (plus de 80% des morts dues au paludisme surviennent sur le continent africain).

Une étude menée sur la même période, et combinant données épidémiologiques, géographiques et démographiques conduisait à un constat plus alarmiste recensant 300 à 600 millions de cas cliniques pour l'année 2002 (Snow *et al.*, 2005) et estimait à 2,2 milliards de personnes la population exposée au risque de paludisme dans le monde. Il reste difficile d'obtenir des données épidémiologiques précises, du fait (i) de la répartition inégale de l'accès aux structures de soin dans l'ensemble des zones endémiques et donc d'un recensement inégal des données, (ii) de la sémiologie courante des accès de fièvre dont la relation causale à l'infection à *Plasmodium* n'est pas systématiquement établie en zone endémique. Récemment la collecte d'informations épidémiologiques au sein d'une base de données (Guerra *et al.*, 2007) appelée MAP (Malaria Atlas Project) par l'équipe de Robert Snow a permis de définir l'état de l'incidence⁶ et la prévalence⁷ du paludisme et, ainsi, d'établir la carte des populations mondiales (Guerra *et al.*, 2008) exposées aux risques de paludisme à *Plasmodium falciparum* au cours de l'année 2007 (Figure 5).

⁵ se dit d'une maladie présente de façon continue dans une région donnée

⁶ l'incidence est le nombre de nouveaux cas d'une pathologie, observés pendant une période donnée et pour une population donnée

⁷ la prévalence est le nombre total d'individus atteints par une pathologie, à un instant donné et pour une population donnée

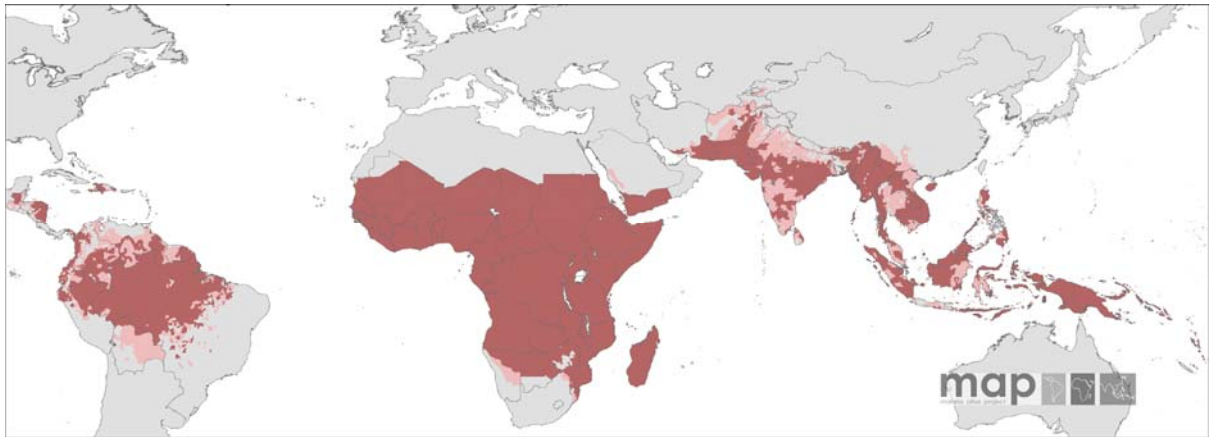


Figure 5 : Carte de la population mondiale exposée au paludisme *Plasmodium falciparum* aux vues de l'incidence mesurée en 2007. Reproduit de (Guerra *et al.*, 2008). En rose sont représentées les zones géographiques stables c'est à dire les zones où l'incidence parasitaire annuelle est supérieure à 0,1, tandis qu'en rouge sont représentées les zones non stables, où l'incidence parasitaire annuelle est inférieure à 0,1.

En termes de mortalité et de morbidité, le paludisme constitue la première maladie parasitaire au monde et fait partie des infections pour lesquelles les traitements ne parviennent pas à diminuer l'endémie actuelle. Devant un tel constat des initiatives tentent d'accroître la prévention, l'accès aux traitements et le soutien des travaux de recherche.

IV. Lutte contre le paludisme

A. Programmes intégrant divers niveaux d'interventions, de la recherche scientifique pour de nouveaux traitements, aux pratiques médicales et aux politiques de prévention

L'augmentation de la prévalence de la maladie, du fait d'une résistance accrue du parasite aux médicaments (en particulier la chloroquine, traitement peu cher et très répandu) et du moustique aux insecticides, souligne la nécessité de découvertes rapides et de mises sur le marché de médicaments novateurs et peu coûteux.

Devant l'endémie persistante, des programmes de prévention et de traitement du paludisme associant divers acteurs ont été initiés (par exemple, le programme Roll Back Malaria⁸ en 1998) avec l'objectif ambitieux de diminuer de moitié le nombre de décès liés au paludisme d'ici 2010. L'état actuel du paludisme dans le monde souligne malheureusement l'échec annoncé des objectifs initiaux. Devant la nécessité de développer de nouveaux traitements anti-parasitaires, que ce soit sous forme de vaccin ou de nouveaux médicaments, des organisations gouvernementales et internationales (OMS, banque mondiale) ou des fonds de type fondations privées (Bill and Melinda Gates Foundation), industriels (Sanofi et Impact Malaria) ont mis en place des programmes intégrant la recherche scientifique pour de nouveaux traitements, les développements de ces traitements, la modernisation des pratiques médicales et l'harmonisation des politiques de préventions. Parmi ces initiatives visant la collaboration de diverses équipes (afin d'éviter la dispersion de fonds et d'énergie),

⁸Ce programme développé par l'OMS et l'UNICEF dans certaines zones impaludées d'Afrique a accru l'accessibilité aux moustiquaires imprégnées, au dépistage et aux traitements actuels.

il est possible de citer le Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), la Medecines for Malaria Venture (MMV) et la Malaria Vaccine Initiative (MVI). Ces deux dernières initiatives sont des PPP (Private Public Partnership) et combinent des fonds tant privés que publics.

L'initiative MR4 tient à disposition des laboratoires de recherche, notamment ceux des zones d'endémie, une banque de matériel (souches de parasites, moustiques, anticorps, matériel génétique, protocoles) et de réactifs. Le MMV se propose, avec le soutien de l'OMS et sur une base de fonds tant publics que privés, d'appuyer financièrement des projets de partenariats de type structure universitaire/industrie pharmaceutique pour le développement de nouveaux médicaments antipaludiques. De même, l'action de la MVI, sous l'impulsion de la fondation Bill et Melinda Gates, a pour objectif de favoriser la collaboration de structures gouvernementales, industrielles et académiques, et soutient des travaux focalisés sur la recherche et le développement de vaccins antipaludiques.

Par ailleurs, la banque de données PlasmoDB, librement consultable à l'adresse <http://plasmoDB.org> (The Plasmodium Genome Database Collaborative, 2001), permet à la communauté scientifique d'accéder à un ensemble d'informations génétiques et moléculaires et fournit un grand nombre d'outils bioinformatiques permettant leur analyse.

Les efforts récents se sont concentrés sur l'exploitation des données génomiques pour tenter d'accélérer la découverte de nouvelles cibles d'intervention (Partie B) et d'autre part d'introduire de nouveaux candidats médicaments (Partie C).

B. La recherche de nouvelles cibles biologiques, à l'aide des approches post-génomiques.

Le séquençage du génome nucléaire de la lignée cellulaire clonale 3D7 de *Plasmodium falciparum*, commencé en 1996, a été achevé et publié en 2002 (Gardner *et al.*, 2002). Le matériel génomique nucléaire est organisé en 14 chromosomes. Sa composition globale en A/T (adénine/thymine) est de 80,6%, ce qui en fait un génome biaisé compositionnellement (particulièrement riche en A/T). Ce biais peut atteindre 90% dans les régions non codantes. Le génome de *P. falciparum* se compose de 23,3 Mb (Kooij *et al.*, 2006) sur lesquels se répartissent 5595 gènes annotés (identifiés par des méthodes de détection automatique de cadres ouverts de lecture) et code pour un total de 5420 protéines (<http://www.eupathDB.org>). Leur rôle n'est pas connu pour la majorité : plus de 60% des protéines sont hypothétiques. Outre un génome nucléaire, le parasite possède un génome mitochondrial de 6 kb ainsi qu'un génome plastidial de 35 kb.

La connaissance des génomes a ouvert les perspectives de nouvelles voies de recherche, que l'on qualifie de recherche post-génomique. Elles visent notamment à annoter les gènes séquencés, caractériser les produits des gènes par des approches globales, par exemple transcriptomiques (Le Roch *et al.*, 2003; Bozdech *et al.*, 2003) ou protéomiques (Florens, 2002), et à identifier ainsi de nouvelles cibles pour le développement de chimiothérapies antipaludiques (Birkholtz *et al.*, 2008; Saidani *et al.*, 2008). Le plus grand défi est certainement d'élucider la fonction des protéines classées hypothétiques ainsi que de définir les interactions entre ces protéines (Wuchty and Ipsaro, 2007). L'intégration de l'ensemble de ces données vise à mutualiser une grande masse de connaissances, en analyser les données rapidement et à grande échelle afin d'affiner la

compréhension des processus biologiques du parasite. Le séquençage complet de *P. falciparum* n'a cependant pas permis de progresser spectaculairement dans notre connaissance de l'agent du paludisme, du fait que plus de la moitié des gènes restent à ce jour de fonction inconnue. Malgré cette déception relative, le nombre de cibles potentielles a beaucoup progressé ([voir plus loin](#)), et la recherche de molécules interférant avec ces cibles nouvelles est rendue possible.

C. La chimiothérapie du paludisme

Depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle, il est possible de recenser environ un nouveau médicament antipaludique par décennie. Les grandes familles de médicaments antipaludiques actuellement utilisés sont représentées ci-dessous ([Tableau 1](#)). L'éventail de molécules utilisables pour traiter le paludisme n'est pas négligeable ([Winstanley et al., 2006](#)), cependant, le nombre de séries chimiques est limité au regard du nombre de parasites. De plus, l'apparition régulière de résistances de parasites aux traitements actuellement préconisés nécessite une recherche continue de médicaments innovants ([Shanks, 2006](#)).

Contrastant avec l'identification plus ou moins rapide de cibles biologiques candidates, l'introduction de nouveaux traitements chimiothérapiques est beaucoup plus longue et coûteuse. Il existe donc d'une part une recherche importante visant à optimiser l'usage des molécules existantes (entre autre par des multi-thérapies) et d'autre part une recherche visant à introduire des composés totalement nouveaux, visant en particulier des cibles nouvelles.

Famille antipaludique	Molécules actives	Cible
4-Aminoquinolines	Chloroquine, Amodiaquine,	Polymérisation de l'hème en hémotoïne
Aryl-amino-alcools	Quinine, Méfloquine, Halofantrine	
8-Aminoquinolines	Primaquine, Tafénoquine	Décomposition de H ₂ O ₂ en oxygènes réactifs
Antifoliques	Sulfadoxine, Dapsone	Dihydroptéroate synthase
Antifoliniques	Pyriméthamine, Proguanil, Cycloguanil	Dihydrofolate reductase
Naphtoquinones	Atovaquone	Cytochrome bc1 (mitochondrie)
Dérivés d'artémisinine	Artémisinine, Artémether, Artésunate	Ca ²⁺ ATPase PfATP6 (orthologue de SERCA), interaction avec l'hémotoïne, réactions radicalaires
Antibiotiques	Doxycycline, Clindamycine, Tétracycline, Azithromycine...	Synthèse des protéines dans l'apicoplaste et la mitochondrie

Tableau 1 : Les grandes familles d'antipaludiques et leurs cibles biologiques. Dans ce tableau, ne sont citées que les molécules commercialisées et utilisées en chimiothérapie curative ou préventive.

1. Les quinoléines

Le mécanisme général d'action des quinoléines, qui sont des dérivés de quinine, repose sur l'inhibition des processus de cristallisation et polymérisation de l'hème en hémotoïne dans la vacuole

digestive du parasite. L'hème est un produit toxique issu de la dégradation de l'hémoglobine par *Plasmodium*. Un processus de détoxification existe dans la vacuole digestive, qui oxyde l'hème en hématine et la polymérise en hématoïne. Les quinolines agissent à diverses étapes-clés de cette détoxification et regroupent plusieurs classes de molécules dont les 4-aminoquinolines et les aryl-amino-alcools. Les mécanismes d'action exacts de ces classes de molécules distinctes diffèrent. Les résistances fréquentes à l'ensemble de ces molécules seraient liées aux modifications d'un transporteur ABC (ATP-binding Cassette), encodé par un gène *mdr* (Multi Drug Resistance), rendu incapable d'importer les quinolines vers leur site d'action : la vacuole digestive.

a) Les 4-aminoquinolines

Les 4-aminoquinolines inhibent la polymérisation de l'hème en hématoïne au sein de la vacuole digestive. Ces molécules sont proches de la quinine, principe actif extrait de l'écorce de l'arbre quinquina, utilisée depuis des centaines d'années en médecine traditionnelle.

La chloroquine est restée pendant longtemps la molécule de première intention. Peu toxique et bon marché, elle reste une molécule antipaludique de première ligne encore couramment distribuée. Cependant l'apparition de résistances sur l'ensemble des zones endémiques limite maintenant son efficacité (Trape, 2001).

Son accumulation dans la vacuole digestive des parasites dégradant l'hémoglobine a pu être démontrée (Saliba *et al.*, 1998). Les mutations dans le gène codant pour un transporteur (impliqué dans le maintien de son accumulation dans la vacuole digestive), PfCRT, sont responsables de l'apparition de résistances à la chloroquine.

b) Les aryl-amino-alcools

Les aryl-amino-alcools sont des molécules de structure proche de la quinine. La quinine est le principal antipaludique injecté par voie intraveineuse dans les cas de paludisme sévère, mais il est toxique pour le système nerveux, d'où la recherche de molécules analogues.

La méfloquine est utilisée régulièrement dans le traitement d'infections chloroquino-résistantes mais son utilisation est restreinte en traitement du fait d'un coût élevé. Elle constitue une prophylaxie⁹ efficace chez l'adulte, cependant des troubles neuropsychiatriques et gastriques consécutifs à son administration ont été reportés.

L'halofantrine a démontré, elle aussi, une bonne efficacité dans le traitement d'infections chloroquino-résistantes mais la toxicité cardiaque (responsable d'arythmies) qu'elle provoque empêche son utilisation en prophylaxie.

c) Les 8-Aminoquinolines

La primaquine est particulièrement utilisée pour traiter les infections à *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*. C'est une molécule particulièrement efficace contre les hypnozoïtes et les gamétocytes, et son usage constitue donc un traitement de choix pour éviter les relapses.

⁹ Processus qui vise à prévenir l'apparition ou la propagation d'une maladie

L'absorption orale de la primaquine est très bonne, mais sa demi-vie est très courte, par conséquent, cette molécule doit être administrée quotidiennement. De plus, l'utilisation de la primaquine a été abandonnée en Afrique du fait de l'hémolyse provoquée chez les patients dont le métabolisme est déficient en glucose-6-Phosphate-deshydrogénase.

La tafénoquine est un analogue de la primaquine, active sur les stades érythrocytaires et les gamétocytes (Newton and White, 1999). La différence principale entre ces deux molécules tient principalement dans le temps de demi-vie (celui de la tafénoquine est plus important). Toutes deux présentent cependant des effets secondaires en particulier des propriétés hémolytiques (Vennerstrom et al., 1999).

2. Les antifolates

a) Les antifoliques

Les antifoliques (sulfadoxine, dapson) sont des inhibiteurs compétitifs de l'activité dihydroptéroate synthétase (DHPS) de la protéine bifonctionnelle hydroxyméthylptérine pyrophosphokinase-DHPS qui catalyse la synthèse de l'acide folique (Triglia et al., 1997).

b) Les antifoliniques

Les antifoliniques (pyriméthamine, proguanil, cycloguanil) ciblent l'activité dihydrofolate réductase (DHFR) de la protéine bifonctionnelle DHFR-thymidylate synthétase. La DHFR a pour rôle de régénérer l'acide folique sous forme réduite, seule forme à céder un groupe méthyle lors de la synthèse de la base purique thymidine. C'est à ce titre que les inhibiteurs de la DHFR possèdent des activités antipaludiques. La DHFR existe chez l'homme mais l'affinité des antifoliniques pour celle-ci est moindre en comparaison de celle pour la DHFR parasitaire. Des mutations apparues dans cette dernière sont responsables de phénomènes de résistance.

3. Les naphthoquinones

L'atovaquone est un analogue structural du coenzyme Q (ubiquinone), qui agit comme un inhibiteur mitochondrial du cytochrome b de la chaîne de transport d'électrons chez les protozoaires. Indirectement, elle inhibe la dihydrorotate déshydrogénase, essentielle à la synthèse *de novo* des bases pyrimidiques. L'atovaquone est efficace en cas d'accès simples de paludisme mais un taux de 30% de recrudescence est observé suite au traitement, ce qui conduit à l'utiliser en association avec le proguanil. Son utilisation est courante en prophylaxie du voyageur en combinaison atovaquone/proguanil, efficace mais d'un coût élevé.

4. Les dérivés d'artémisinine

L'artémisinine (qinghaosu) est le principe actif extrait de l'armoise (*Artemisia annua*), utilisée en médecine chinoise traditionnelle depuis plus de 2000 ans. C'est une lactone sesquiterpénique qui possède deux atomes d'oxygène liés par un pont endopéroxyde dont le clivage est à l'origine de la production de radicaux libres. Son extraction demeure d'un coût élevé, mais l'absence actuelle de résistances avérées justifie son utilisation en bithérapie (ACT, Artemisinin-based Combination

Therapy) en traitement de première intention ; elle est aussi utilisée dans les cas de paludisme sévère (recommandations de l'OMS).

Afin de diminuer les coûts de production, des molécules semi-synthétiques ont été développées : artéméther, artééther, artésunate ([Meshnick et al., 1996](#)). Ce dernier est notamment utilisé chez les enfants atteints d'accès graves de paludisme sous forme de suppositoires dans les zones endémiques multirésistantes. Malheureusement, si l'action des dérivés d'artémisinine est extrêmement rapide et efficace, sa demi-vie est très courte et n'est pas compatible avec une prescription en une unique dose.

Par ailleurs, l'apparition de résistances à l'artémisinine chez des parasites cultivés *in vitro* ([Jambou et al., 2005](#)) laisse craindre une apparition de résistance en particulier en cas de monothérapie ([Duffy and Sibley, 2005](#)).

5. Les antibiotiques

Les cyclines dont la doxycycline (utilisée en prophylaxie tant en mono que bithérapies) et la tétracycline, les lincosamides dont la clindamycine et les macrolides dont l'azithromycine sont des antibiotiques utilisés en traitement du paludisme. Ils inhibent les mécanismes de synthèse des protéines dans l'apicoplaste et la mitochondrie ([Tableau 2](#)).

6. Molécules en développement

Devant l'apparition de résistances de *Plasmodium falciparum* à la quasi-totalité des familles thérapeutiques existantes, il apparaît nécessaire et urgent de prévoir régulièrement la mise sur le marché de nouveaux médicaments afin d'anticiper l'apparition de nouvelles résistances ([Figure 6](#)). Or la découverte de molécules innovantes est corrélée à la découverte de cibles potentielles, d'où la nécessité d'une compréhension de l'ensemble des voies métaboliques du parasite. Une vue d'ensemble des voies métaboliques du parasite est représentée ci-dessous, incluant les cibles des molécules couramment utilisées et des molécules en développement. Parmi celles-ci on peut citer de nombreuses molécules ciblant des voies métaboliques apicoplastiques : la fosmidomycine (inhibiteur de la synthèse des isoprénoïdes), la thiolactomycine (inhibiteur de la synthèse des acides gras par le système FAS2) et le triclosan (inhibiteur de la synthèse des acides gras par le système FAS2).

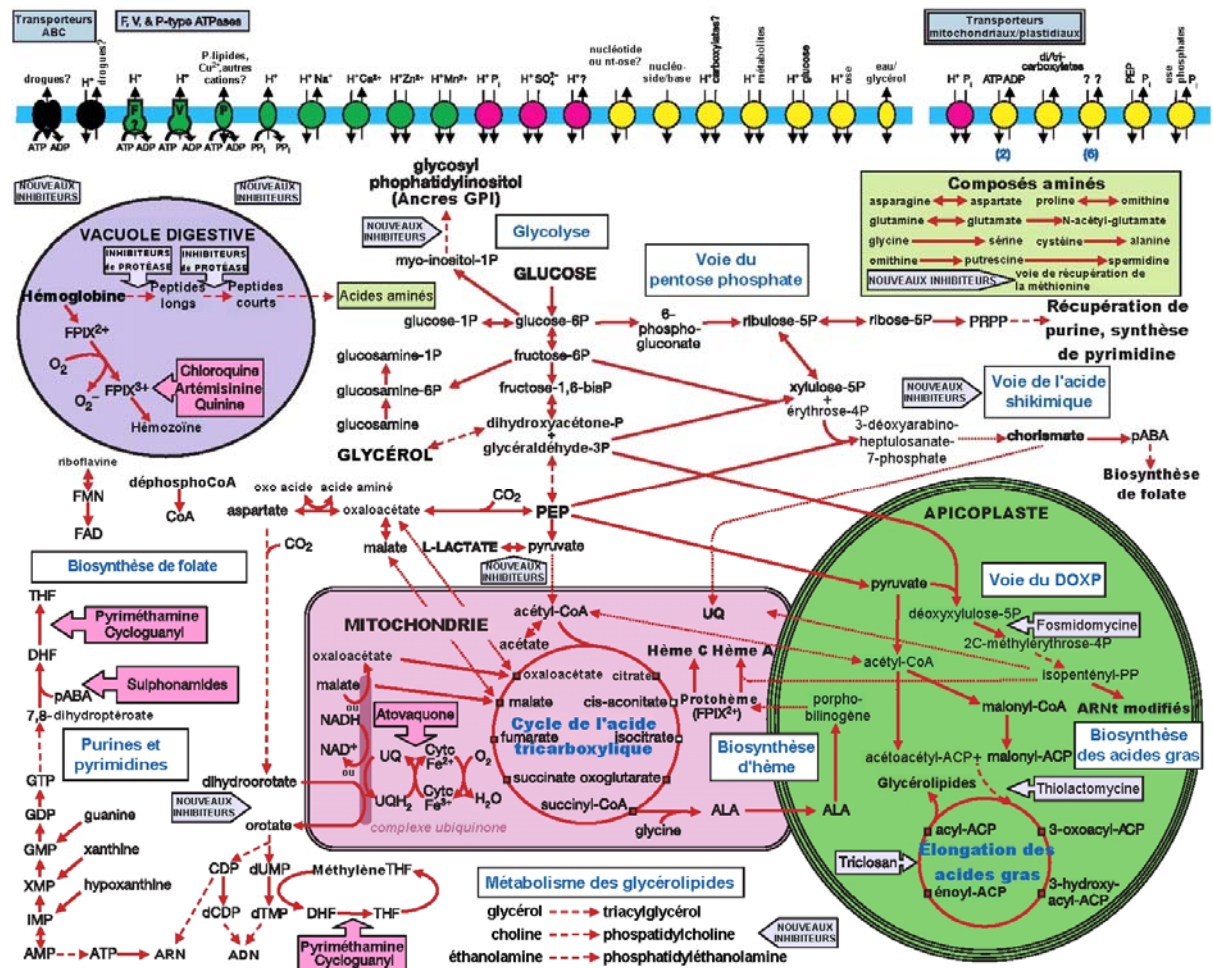


Figure 6 : Vue d'ensemble des grandes voies métaboliques de *Plasmodium falciparum*. Les molécules inhibitrices de voies métaboliques sont indiquées par des flèches (Gardner et al., 2002).

Des projets en phase clinique permettent d'envisager l'introduction à moyens termes de nouveaux traitements. En particulier au niveau du métabolisme des lipides, des molécules analogues de choline ciblant les voies de synthèse des phospholipides ont été synthétisées, parmi lesquelles le composé T3, comportant un noyau bithiazolium, actuellement en essai clinique de phase I (projet porté par l'UMR 5235, Université de Montpellier, où j'ai réalisé l'essentiel de mes expérimentations) (Wengelnik et al., 2002; Ancelin et al., 2003a; Ancelin et al., 2003b; Vial et al., 2004).

Le projet présenté dans ce manuscrit est en amont, visant entre autres à explorer une stratégie nouvelle pour identifier et proposer de nouveaux composés potentiellement antipaludiques. Ce projet plus prospectif, porté par l'UMR 5168 (CEA Grenoble), repose sur la parenté évolutive entre le plaste des Apicomplexes, et les plastides des algues et des plantes. Il concerne une classe de lipides, les galactolipides, constituants essentiels de l'enveloppe chloroplastique et dont la présence dans *Plasmodium* a été la base de mon travail.

V. L'apicoplaste

La plupart des Apicomplexes (protozoaires parasites à mode de vie intracellulaire) possèdent une structure plastidiale (Figure 7), non photosynthétique, contenant un ADN circulaire de 35 kb. Cet ADN a été isolé en 1991 (Gardner *et al.*, 1993; Gardner *et al.*, 1991a; Gardner *et al.*, 1991b) et sa séquence paraît être l'homologue de celle trouvée chez tous les chloroplastes étudiés à ce jour, chez les plantes supérieures et les algues, excepté que l'ADN ne porte pas de gènes impliqués dans la photosynthèse. L'organe qui le contient, baptisé apicoplaste, a été détecté par microscopie puis par hybridation *in situ* en 1996 (Wilson *et al.*, 1996) et se caractérise par 4 membranes limitantes.

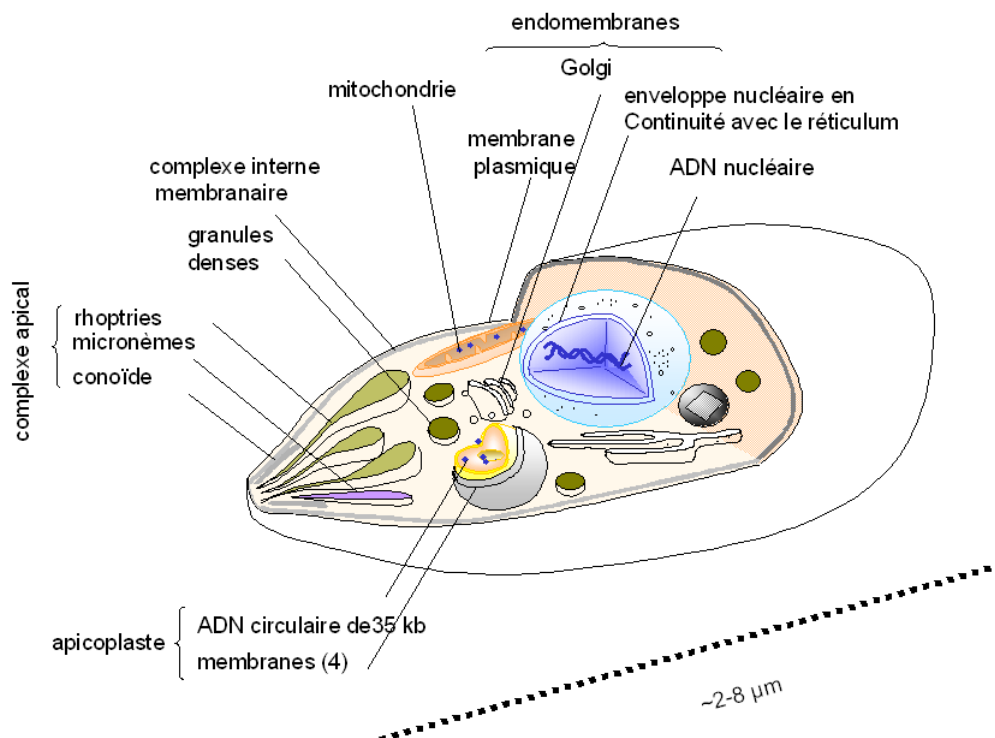


Figure 7 : Représentation schématique d'un parasite Apicomplexe. Outre les éléments indispensables à toute cellule eucaryote, les caractéristiques communes aux formes invasives des Apicomplexes sont la présence d'un complexe apical composé d'organites vésiculaires sécrétoires indispensables à l'invasion (rhoptries, micronèmes et granules denses), et, chez la plupart d'entre eux (à l'exception de *Cryptosporidium*), d'un plaste appelé apicoplaste délimité par 4 membranes (Bisanz *et al.*, 2006). Le conoïde, structure présente dans le complexe apical de nombreux Apicomplexes est absent chez les genres *Plasmodium*, *Babesia* et *Theileria*.

Sur le plan phylogénétique, cette structure plastidiale a pour origine une endosymbiose secondaire entre deux eucaryotes, avec ingestion d'une algue rouge unicellulaire ancestrale par un protozoaire, ancêtre de l'ensemble des Apicomplexes. Le plaste de l'algue rouge résulte lui-même d'une endosymbiose primaire d'une cyanobactérie et un eucaryote primitif. L'endosymbiose secondaire a été suivie d'une disparition de la plupart des structures subcellulaires de l'algue et s'est accompagnée d'un transfert génétique vers le noyau de la cellule hôte. Le plaste est par conséquent la seule structure membranaire apparemment conservée : l'apicoplaste des Apicomplexes se trouve alors limité par trois à quatre membranes (Figure 8). Le nombre exact de membranes apicoplastiques chez *Plasmodium* est l'objet d'un débat, bien qu'un consensus sur l'existence de quatre membranes

semble se dégager (Waller and McFadden, 2005). La membrane la plus externe relève, pour sa part, du système endomembranaire.

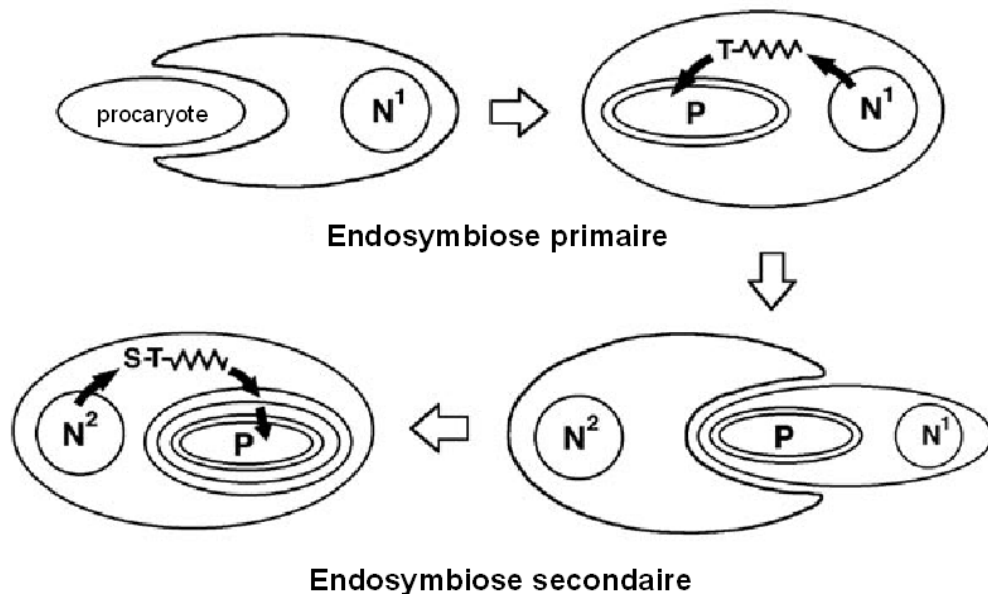


Figure 8 : Origines du plaste des Apicomplexes. S, peptide signal ; T, peptide de transit ; P, plaste ; N¹, noyau de l'algue rouge unicellulaire ; N², noyau de l'Apicomplexe (Waller and McFadden, 2005).

L'hypothèse d'une origine de l'apicoplaste consécutive à une endosymbiose multiple est confortée par le mécanisme d'adressage des protéines codées par le génome nucléaire (Figure 8). La dissection de leurs séquences peptidiques a en effet révélé la présence d'un domaine bipartite N-terminal dans les protéines de l'apicoplaste. Ce domaine bipartite comprend un peptide signal qui permet l'entrée dans le système endomembranaire et d'un peptide d'adressage impliqué dans l'import dans l'apicoplaste (Foth et al., 2003). Ce processus se décompose en une entrée dans le système endomembranaire, médiée par un peptide signal classique, hydrophobe, qui est immédiatement clivé, puis en une entrée dans le stroma de l'apicoplaste, médiée par un peptide de transit de type chloroplastique riche en asparagine et lysine.

Les protéines de l'apicoplaste pour lesquelles il est possible de prédire une fonction sont impliquées dans des voies métaboliques largement retrouvées dans les cyanobactéries, les algues rouges et les végétaux supérieurs. Les principales identifiées à ce jour sont : la synthèse d'isoprénoides par une voie indépendante du mévalonate (Jomaa et al., 1999), la synthèse d'acides gras par le système FAS2 (Waller et al., 1998) ou d'hèmes (Surolia and Padmanaban, 1992).

Chez les Apicomplexes, l'intégrité du plaste paraît essentielle à la survie du parasite. Il a ainsi été montré chez *Toxoplasma gondii* que les parasites chez qui l'apicoplaste était absent suite à un défaut de ségrégation n'étaient pas viables (He et al., 2001). Cependant la mort observée des parasites (tant par atteinte génétique que par traitement par des molécules ciblant le métabolisme apicoplastique) est retardée. Ainsi chez *Plasmodium*, l'utilisation d'antibiotiques n'affecte pas directement le cycle auquel les parasites ont été traités : les parasites complètent leur cycle, ré-

envahissent des globules rouges et arrêtent leur développement seulement à la schizogonie du cycle suivant (Dahl and Rosenthal, 2007; Goodman *et al.*, 2007).

L'origine végétale de l'apicoplaste a aussi ouvert la voie à une recherche de molécules thérapeutiques innovantes correspondant à de nouvelles familles de médicaments que l'on peut qualifier de médicaments-herbicides.

Cibles générales	Molécules actives	Cibles spécifiques dans l'apicoplaste
Machinerie de transcription / traduction	lincosamides (clindamycine); macrolides (azithromycine); thiopeptides (thiostrepton, micrococcine)	Initiation de la transcription
	chloramphénicol; kirromycine; amythiamicie A GE2270A; encyloxine IIa	Elongation de la traduction, facteur EF-Tu
	rifampicine, rifabutine	Sous-unité β de la RNA polymérase
	tétracycline	ribosome 70S
Réplication de l'ADN	quinolones et fluoroquinolones (ciprofloxacine, norfloxacine, trovofloxacine)	ADN gyrase
Synthèse des acides gras (acide gras synthase de type II)	herbicides aryloxyphénoxypropionate (fop) (haloxyfop, clodinafop, quizlofop, diclofop); fenoxaprop; tralkoxydim	Acétyl-CoA carboxylase (ACCase)
	thiolactomycine et analogues	β -cétolACP synthase II (FabF) et β -cétolACP synthase III (FabH)
	cérulénine	β -cétolACP synthase II (FabF)
	triclosan, isoniazide	Enoyl-ACP réductase (FabI)
Synthèse des isoprénoides	fosmidomycine, FR-900098	DOXP réductoisomérase
Peptide déformylase	actinonine	Peptide déformylase

Tableau 2 : Molécules potentiellement actives au niveau de processus essentiels se déroulant dans l'apicoplaste, ayant des propriétés anti-parasitaires *in vitro* et/ou *in vivo* (Wiesner and Seeber, 2005).

VI. La synthèse des galactolipides chloroplastiques, une cible pour des herbicides antipaludiques ?

Chez les plantes, les membranes de plastides sont constituées aux trois-quarts de galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol, ou MGDG et digalactosyldiacylglycérol ou DGDG). La présence de lipides aux propriétés chromatographiques indiscernables du MGDG et du DGDG a été mesurée chez les parasites Apicomplexes *P. falciparum* et *T. gondii* (Marechal *et al.*, 2002). Dès lors, s'est posée la question de la présence d'une voie de biosynthèse des galactolipides dans l'apicoplaste

comparable à celle existant dans les plastes végétaux. Les possibilités de cibler une telle voie de synthèse afin de développer une nouvelle classe de molécules ayant des propriétés anti-parasitaires et herbicides ont également justifié cette thématique.

Après des rappels de la dynamique membranaire et du trafic cellulaire chez les stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*, cette thèse explore l'hypothèse de la présence d'une voie de synthèse de galactolipides chez *Plasmodium falciparum*.

Dans un premier temps, ce manuscrit présente des travaux visant à caractériser des lipides membranaires ayant des propriétés proches des galactolipides chloroplastiques chez *Plasmodium falciparum*, en particulier un épitope de structure proche des galactolipides dont la distribution subcellulaire au cours du cycle érythrocytaire a été étudiée par diverses approches (microscopique, biochimique, moléculaire). Ces données sont intégrées à une étude plus large sur le modèle *Toxoplasma* et ont fait l'objet d'une publication ([Botte et al., 2008](#)). Dans un second temps, ce manuscrit décrit l'identification de molécules inhibitrices de l'activité de synthèse de galactolipides chez les plantes, et leur caractérisation et optimisation en qualité d'inhibiteurs de la prolifération du parasite *Plasmodium*, en système *in vitro*. Ces données font l'objet de deux dépôts de brevets européens ([EU 07290684.5](#), [EU 07290683.7](#), 2007) et d'articles en préparation.

Données bibliographiques

Les études présentées dans ce mémoire de thèse traitent de la question de la synthèse et de la dynamique de glycérolipides membranaires chez les parasites Apicomplexes, en particulier *Plasmodium falciparum*. Elles se focalisent sur les galactolipides dont la biosynthèse pourrait impliquer l'apicoplaste, suivant le modèle du métabolisme lipidique connu chez les plantes. Ce chapitre a pour objectif de montrer l'état des connaissances concernant l'organisation membranaire de la cellule parasitaire, et les données encore fragmentaires relatives au métabolisme et à la dynamique des acyl-lipides chez *P. falciparum*.

I. *Plasmodium falciparum* : une compartimentation membranaire à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule parasitaire

Plasmodium falciparum est un eucaryote (Figure 7) dont le cycle de vie implique une propagation à l'intérieur d'autres cellules eucaryotes, en particulier au sein du globule rouge (Figure 3). Le globule rouge mature diffère des autres cellules de mammifères par (i) la forte concentration d'hémoglobine cytoplasmique qu'il contient (30 pg par globule rouge), (ii) un cytosquelette très particulier constitué d'un réseau sous-membranaire hexagonal de fibres de spectrine flexibles, qui permet à la membrane du globule de se déformer pour circuler dans les fins capillaires, et dont les nœuds sont associés à de courts filaments d'actine (Dhermy *et al.*, 2007), (iii) l'absence d'organites intracellulaires tels que noyau, mitochondrie ainsi que de compartiments membranaires intracellulaires tels que réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes, (iv) en conséquence l'absence de mécanismes de néosynthèse de lipides ou de protéines, ainsi que (v) l'absence de trafic protéique par mécanisme d'endocytose. Cette dernière particularité empêche le détournement de toute « machinerie » de transport par le parasite.

Chez l'être humain, *Plasmodium falciparum* se comporte comme un parasite à mode de vie intracellulaire obligatoire. Ce mode de vie lui permet un échappement facilité au système immunitaire, favorisé par l'absence de complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) à la surface du globule rouge mature. En revanche, il constitue une barrière à l'acquisition de nutriments et de précurseurs métaboliques à partir du milieu extérieur plasmatique. Or, au cours de son cycle parasitaire intraérythrocytaire, *Plasmodium falciparum* nécessite une importante quantité de molécules, notamment des molécules telles que des nutriments énergétiques, des ions précurseurs de synthèse de macromolécules, des cofacteurs de réactions enzymatiques, des protéines dont l'hémoglobine et des lipides. Ces derniers participent à l'élaboration de membranes pour son développement et sa multiplication. À l'intérieur du globule rouge, le parasite met en place des processus et établit des systèmes vésiculaires ou membranaires (Figure 9) qui facilitent les déplacements de lipides et de protéines indispensables à son développement. La mobilisation de mécanismes d'import et d'export originaux (*via* l'activation de voies de transport membranaires) sont des facteurs clefs pour l'installation du parasite dans l'érythrocyte, sa croissance et son développement.

Ces mécanismes comprennent (i) l'invagination de la membrane de la cellule hôte au cours de l'invasion, qui a pour résultat la formation d'une vacuole parasitophore qui entoure l'organisme intracellulaire, (ii) le maintien d'une vacuole digestive plasmodiale, (iii) la production d'antigènes et d'altérations structurales dans le cytoplasme et la membrane du globule rouge, (iv) le développement de nouvelles voies d'import de nutriments, (v) le développement d'une machinerie d'export vers les territoires vacuolaires et érythrocytaires (Haldar *et al.*, 2002).

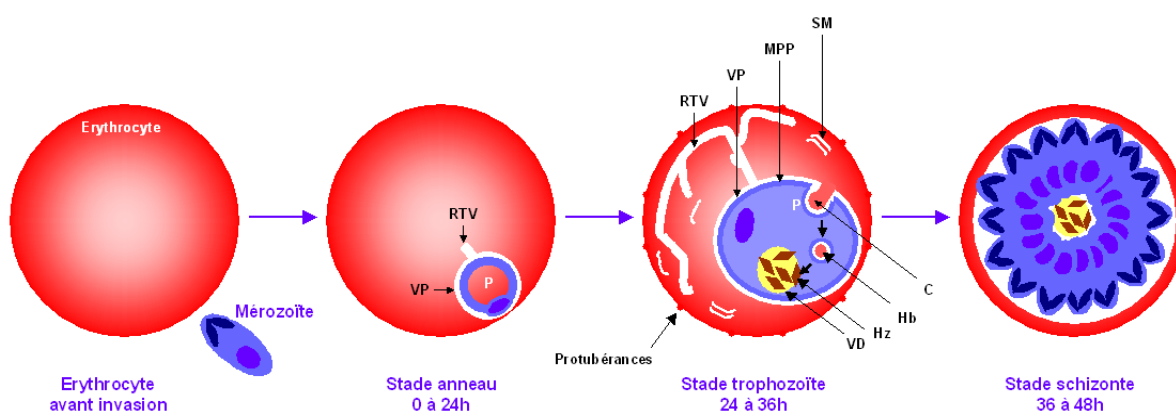


Figure 9 : Développement de *Plasmodium* au cours du cycle érythrocytaire. Dès son entrée dans le globule rouge, *Plasmodium falciparum* met en place une quantité considérable de membranes permettant son développement intraérythrocytaire du stade anneau au trophozoïte puis schizonte. Lors de ce processus, il induit notamment la formation d'une vacuole parasitophore qui le sépare du cytoplasme de la cellule hôte et au sein de laquelle il se développe. Dès le stade anneau, un réseau tubulo-vésiculaire est formé. Par ailleurs, un intense trafic vésiculaire d'hémoglobine entre le compartiment cytoplasmique érythrocytaire et la vacuole digestive du parasite se met en place. Au stade schizonte, les futurs mérozoïtes se développent et leur individualisation requiert la production d'une importante quantité de nouvelles membranes pour la reproduction de ses organites et la formation des nouveaux parasites. P, parasite ; RTV, réseau tubulo-vésiculaire ; VP, vacuole parasitophore ; MPP, membrane plasmique parasitaire ; SM, Structures de Maurer ; C, Cytostome ; Hb, hémoglobine ; Hz, hémozoïne, produit de la digestion de l'hémoglobine ; VD, vacuole digestive.

Cette première partie décrit la compartimentation membranaire et sa dynamique chez *P. falciparum* en traitant des compartiments rencontrés communément chez l'ensemble des eucaryotes, ainsi que des structures membranaires spécifiques de *P. falciparum*, intra- et extra-parasitaires. Les processus de biogenèse lipidique membranaire associés, connus à ce jour, sont résumés.

A. Compartimentation subcellulaire de *Plasmodium falciparum*

1. Le système endomembranaire

a) Schéma général chez les eucaryotes

Dans les cellules eucaryotes, les compartiments membranaires ne sont pas strictement délimités les uns des autres par des membranes figées. Un flux endomembranaire continu existe entre l'enveloppe nucléaire, le réticulum, le Golgi, les endosomes, les vacuoles, *etc.* et la membrane plasmique, soit du fait de la connexion directe entre ces compartiments, soit par un transit de vésicules qui bourgeonnent à partir d'un compartiment et fusionnent avec un autre (Figure 10). Ce flux membranaire permet le transfert spontané de lipides polaires. Si la diffusion de lipides par le flux membranaire n'était pas contrôlée et régulée, une distribution uniforme serait observée, ce qui n'est

pas le cas. Les organites semi-autonomes simples tels que les mitochondries et les plastes primaires sont en dehors de ce flux membranaire (Figure 10).

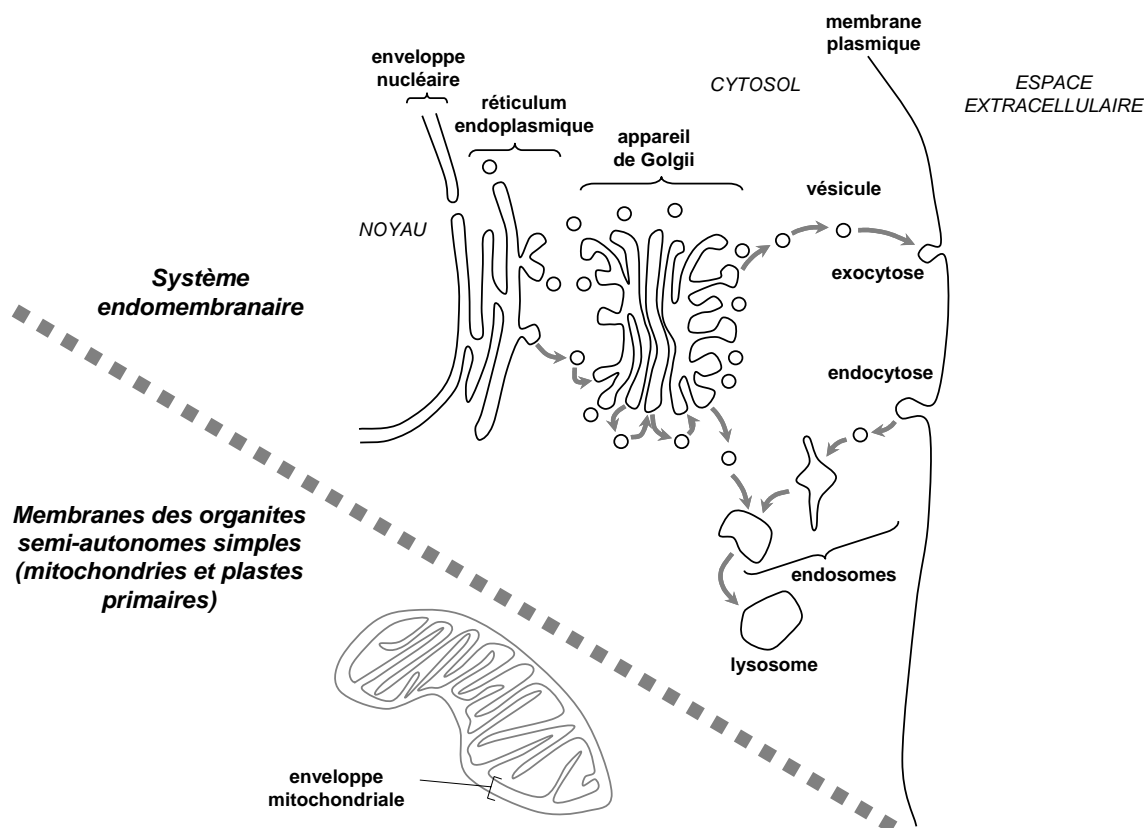


Figure 10 : Compartimentation des cellules eucaryotes et trafics membranaires. Le système endomembranaire est constitué de compartiments dont la biogenèse et la dynamique sont liées à l'échelle de la cellule entière par connexion membranaire directe ou trafic vésiculaire. Les transferts de lipides peuvent s'effectuer spontanément par diffusion latérale et au cours du trafic vésiculaire. Des mécanismes de tri sont opérés au cours de ce trafic membranaire, aboutissant à des membranes de compositions lipidiques distinctes. Les membranes des organites semi-autonomes simples (mitochondries et plastes primaires) ont une biogenèse et une dynamique membranaire en dehors du trafic vésiculaire général. Les transferts de lipides d'une membrane à une autre, depuis et / ou vers le système endomembranaire, nécessitent l'emprunt de systèmes spécifiques de transport.

La cellule plasmodiale possède un système membranaire caractéristique d'une cellule eucaryote, complété par des compartiments propres aux Apicomplexes et comprenant :

- les compartiments classiques du système endomembranaire : un réticulum endoplasmique (RE) périnucléaire et cytoplasmique, un appareil de Golgi (Struck *et al.*, 2008) et une membrane plasmique ;
- un complexe membranaire interne (CMI) situé sous la membrane plasmique, constitué de saccules aplatis et sous-tendu par un réseau de microtubules. L'ensemble constitué par la membrane plasmique parasitaire et les deux membranes du complexe membranaire interne auxquelles elle est connectée par de fins filaments, est appelé le complexe pelliculaire.
- *P. falciparum* contient aussi des organites de sécrétion spécifiques des Apicomplexes (complexe apical): les micronèmes, les rhoptries les granules denses et les exonèmes,

dont les décharges sont séquentielles pour la plupart au moment de l'invasion et qui participent notamment à la formation de la vacuole parasitophore ;

- *P. falciparum* possède deux organites semi-autonomes, acquis au cours d'événements endosymbiotiques, délimités par de multiples membranes: une mitochondrie (deux membranes) et l'apicoplaste (quatre membranes dont la plus externe relève du système endomembranaire). D'un point de vue topologique, ces deux organites sont associés et interdépendants. Dans les stades jeunes précédant la schizogonie, ils se ramifient tous deux, puis se divisent de concert de sorte que chaque mérozoïte formé soit doté d'une mitochondrie et d'un apicoplaste uniques ([van Dooren et al., 2005](#)).

b) Spécificité du système endomembranaire chez *Plasmodium falciparum*

P. falciparum possède un système endomembranaire permettant entre autres l'adressage de protéines par un système vésiculaire vers l'ensemble des organites du parasite. Cette voie emprunte classiquement trois grands compartiments membranaires : l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique, et l'appareil de Golgi.

- Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est peu abondant ou indétectable dans le cytoplasme du mérozoïte. Mais il se re-déploie au cours du stade anneau pour atteindre son développement maximal à la fin du stade trophozoïte, stade au cours duquel la synthèse protéique est intense. Chez les eucaryotes, le réticulum endoplasmique constitue la première étape de tri des protéines non cytoplasmiques : les protéines sécrétées sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique puis entrent dans la voie sécrétoire *via* les citernes golgiennes par l'intermédiaire de vésicules recouvertes des protéines COP I pour les voies rétrogrades et COP II pour les voies antérogrades ([Adisa et al., 2002](#)), de la même manière que chez l'ensemble des eucaryotes. Il est ainsi considéré comme le compartiment initial du flux endomembranaire.

Le réticulum endoplasmique joue également un rôle central dans la néosynthèse des lipides (notamment de l'acide phosphatidique et des phospholipides à partir du diacylglycérol).

- L'enveloppe nucléaire

Le noyau est délimité par une enveloppe nucléaire classique. Celle-ci est constituée par la l'association de deux membranes. La membrane située en regard de la face cytoplasmique est tapissée de ribosomes et a valeur d'élément du réticulum endoplasmique. La membrane interne, séparée de la membrane externe par l'espace péri-nucléaire, est tapissée d'une lame dense fibreuse interne ou *lamina*. L'enveloppe nucléaire est interrompue par des pores qui constituent un lieu de passage obligatoire pour les éléments qui transitent entre le cytoplasme et le noyau.

- L'appareil de Golgi

Lieu des modifications post-traductionnelles, notamment de N-glycosylations ([Kimura et al., 1996](#)), l'appareil de Golgi est aussi un site de tri des protéines vers leur destination finale, ainsi qu'un

lieu de synthèse et de remaniements lipidiques importants (céramides, sphingomyéline, et glycosphingolipides). Il est subdivisé en trois compartiments distincts (cis, intermédiaire et trans) qui ne possèdent pas la même composition lipidique. C'est un organite en constante instabilité dynamique du fait de son bourgeonnement et de la continue arrivée de vésicules tant au niveau cis- (en provenance du réticulum endoplasmique) que trans-golgien (en provenance de la membrane plasmique). Bien décrit chez *Toxoplasma gondii* (Joiner and Roos, 2002), l'appareil de Golgi est nettement moins bien caractérisé chez *Plasmodium*. Le complexe golgien y diffère des structures habituelles (y compris de celles de *Toxoplasma gondii*). Notamment, on n'observe pas d'empilements de citernes golgiennes chez *Plasmodium* comme le montre l'utilisation de marqueurs des sous-compartiments de l'appareil de Golgi. Ces marqueurs, tels PfERD2 (récepteur à motif XDEL) et GRASP, marqueurs du réseau cis-golgien, ou Rab6 du réseau trans-golgien, permettent de suivre l'évolution de l'organite (Struck et al., 2005; Struck et al., 2008). Apparemment absent du mérozoïte infectieux, l'appareil de Golgi se reforme au cours du développement du stade anneau par rapprochement de vésicules mantelées issues de l'enveloppe nucléaire et apparaît sous forme d'un tubule unique apposé à l'enveloppe nucléaire chez l'anneau plus avancé. Sa structure se complexifie en stade trophozoïte, au cours duquel il apparaît constitué d'un ensemble de vésicules mantelées et non mantelées. Puis, au cours du stade schizonte, l'appareil de Golgi se développe de telle sorte que plusieurs compartiments golgiens sont visibles, qui équiperont chacun des mérozoïtes en formation (Struck et al., 2005).

- La membrane plasmique du parasite

La membrane plasmique la plus étudiée est celle du mérozoïte. Elle est doublée d'un manteau (15 nm d'épaisseur) formant des projections filamenteuses. La membrane plasmique parasitaire est contenue dans un complexe pelliculaire constitué de la membrane plasmique et de deux membranes du complexe interne membranaire connecté à cette dernière par de fins filaments. On peut noter que le complexe est inexistant à l'extrémité apicale du parasite et que l'intégrité des microtubules sous pelliculaires est nécessaire à l'invasion du globule rouge par le mérozoïte (Pinder et al., 2000).

- Le complexe membranaire interne

Le complexe membranaire interne (CMI) est constitué de deux membranes apposées, qui sous-tendent la membrane plasmique parasitaire. Les deux membranes du CMI et la membrane plasmique forment la pellicule. A l'échelle de la cellule entière, le CMI consiste en un arrangement longitudinal d'une couche unique de vésicules aplaties. Le CMI des Alvéolés dérive du réticulum endoplasmique. Il en résulte l'appartenance de cette structure au système endomembranaire. Sous le CMI, s'étendent des microtubules appelés microtubules sous-pelliculaires.

- Le complexe apical

Le système endomembranaire est, comme nous venons de le décrire, connecté dynamiquement par un intense trafic de vésicules. Une part de ce trafic aboutit à des processus

spécialisés de sécrétions (le système sécrétoire est souvent considéré en aval du système endomembranaire). Chez *P. falciparum*, le système sécrétoire implique des organites spécialisés, fondamentaux pour le mode de vie parasitaire, à l'apex de la cellule, collectivement appelés complexe apical.

- Les rhoptries sont au nombre de deux chez le mérozoïte. Leur biogenèse résulte d'un trafic vésiculaire à partir de l'appareil de Golgi. Délimitée par une bicouche lipidique, en microscopie électronique, leur lumière apparaît constituée d'un fin matériel granulaire. Elles sont composées de deux sous-compartiments distincts : le col et le bulbe des rhoptries, dont les contenus sont distincts. Il semble qu'il existe des trafics vésiculaires sélectifs distincts vers les deux sous-compartiments des rhoptries en formation ([Bannister et al., 2000](#)). Parmi les éléments majoritaires des rhoptries, un complexe de protéines de hauts poids moléculaires comprend le complexe RhopH, composé principalement des protéines RhopH1, RhopH2 et RhopH3 ([Kaneko, 2007](#)) et un complexe de bas poids moléculaire, Rap, composé principalement des protéines Rap1, Rap2 et Rap3 ([Kats et al., 2006](#)). Ces protéines sont exprimées tardivement au cours du cycle érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*, ce qui suggère une fonction des protéines des rhoptries exclusivement au cours de l'invasion et de la formation de la vacuole parasitophore ([Kats et al., 2008](#)).

- Les micronèmes, plus petits et plus nombreux que les rhoptries, sont issus d'un bourgeonnement de l'appareil de Golgi et sont transportés le long des microtubules sous-pelliculaires vers l'apex du mérozoïte. Chez *Plasmodium falciparum*, parmi les protéines de micronèmes, plusieurs protéines impliquées dans l'invasion des globules rouges par le parasite ont été étudiées. D'une part, EBA175 ([Healer et al., 2002](#)), se lie aux résidus d'acide sialique présents sur la protéine glycophorine A, particulièrement abondante à la surface de l'érythrocyte. D'autre part, PfAMA1 (Apical Membrane Antigen 1) est une protéine intégrale de membrane de type I qui possède un propeptide en région N-terminale, excisé au moment de sa translocation à la surface du mérozoïte ([Healer et al., 2002](#)). La mise en contact de cultures de parasites avec des anticorps dirigés contre PfAMA1 interfère avec l'invasion. Elle semble interagir avec la protéine PfRON4, elle-même localisée dans le col des rhoptries ([Alexander et al., 2006](#)), soulignant ainsi la collaboration entre micronèmes et rhoptries au cours du processus d'invasion. ([Bannister et al., 2003](#)). Enfin, MTRAP (Merozoite Thrombospondin Related Anonymous Protein) est une protéine micronémale homologue de la protéine TRAP retrouvée chez le sporozoïte. Elle est impliquée dans la mobilité par glissement. Elle est localisée à l'extrémité apicale des mérozoïtes libérés dans le sang, et colocalise avec PfAMA1 ([Baum et al., 2006](#)). C'est une protéine de surface (domaines thrombospondines répétés) qui semble sécrétée au même moment que PfAMA1. MTRAP jouerait un rôle dans la reconnaissance par le mérozoïte de la membrane globule rouge à infecter.

- Les granules denses sont, comme les micronèmes, issus d'un bourgeonnement de l'appareil de Golgi. Cependant, à la différence des micronèmes, les granules denses ne sont pas transportés vers l'apex du mérozoïte. Ils possèdent un contenu finement granulaire. Chez *Plasmodium knowlesi*,

leur décharge a pu être observée en microscopie électronique : leur contenu est relargué dans la vacuole parasitophore suite à leur exocytose à travers la pellicule (Torii *et al.*, 1989).

- Les exonèmes sont des organites sécrétoires du complexe apical récemment décrits (Yeoh *et al.*, 2007). De nature vésiculaire, ils sont clairement distingués des rhoptries par leur taille réduite et des granules denses (auxquels ils ressemblent fortement) par leur forme allongée. Contrairement aux organites du complexe apical décrits précédemment, le contenu des exonèmes n'est pas sécrété au cours de l'invasion mais avant même la rupture du schizonte dans la vacuole parasitophore. A l'heure actuelle, la seule protéine caractérisée des exonèmes est *PF*SUB1.

- La vacuole digestive

La vacuole digestive est un organite important pour le parasite. Elle est d'une part, le lieu d'import et de digestion d'hémoglobine détournée de l'érythrocyte (grâce à des protéases résidentes de la vacuole digestive). De plus, un flux de vésicules endocytées depuis le cytostome fusionne régulièrement avec la membrane de la vacuole digestive. Il existe des cytostomes qui alimentent la vacuole digestive par internalisation de vésicules contenant du cytoplasme érythrocytaire chargé en hémoglobine. La digestion de l'hémoglobine, essentiellement au cours du stade trophozoïte, provoque l'accumulation d'un produit de dégradation : l'hème, molécule toxique pour le parasite de par ses actions oxydantes, les ruptures de membranes ainsi que de par les processus d'inhibition enzymatique qu'il entraîne. La vacuole digestive est d'autre part le site de détoxification de l'hème par sa conversion en un pigment insoluble : l'hémozoïne (Jackson *et al.*, 2004). Son pH est de l'ordre de 5,2 pour un pH cytoplasmique qui est de l'ordre de 7,2 (Kuhn *et al.*, 2007).

La vacuole digestive semble se mettre en place dès l'emprisonnement initial de cytoplasme érythrocytaire par le parasite (voir plus loin partie I C 2) qui constitue la première « gorgée d'hémoglobine » (Elliott *et al.*, 2008). Elle peut aisément être visualisée par immunodétection dirigée contre une de ses protéines de membrane, la protéine *Pf*CRT (Chloroquine Resistant Transporter) (Martin and Kirk, 2004).

Des corps lipidiques (lipides neutres) ont été révélés au sein de la vacuole digestive par coloration au rouge de Nil. Ils paraissent particulièrement enrichis en diacylglycérol et triacylglycérol (Jackson *et al.*, 2004).

2. Les membranes des organites semi-autonomes

P. falciparum possède des organites semi-autonomes : une mitochondrie qui contient un génome de 6 kb et un apicoplaste, qui contient un génome de 35 kb.

a) L'enveloppe mitochondriale

Chez *Plasmodium falciparum*, on trouve une unique mitochondrie allongée, tubulaire située directement sous la pellicule, classiquement entourée de deux membranes mitochondriales (une membrane interne et une membrane externe). La taille de la mitochondrie augmente au cours de

l'évolution de l'anneau et du trophozoïte. L'enveloppe mitochondriale ne montre pas de connexion vésiculaire avec les compartiments endomembranaires.

b) Les membranes limitant l'apicoplaste

L'apicoplaste est un organe de petite taille qui se présente sous forme de tubulures vésiculaires. Son aspect est assez proche de celui de la mitochondrie, à laquelle l'apicoplaste reste intimement lié ([van Dooren et al., 2005](#)). De fait, ces deux organites subissent un développement parallèle. L'apicoplaste est aussi lié aux microtubules sous-pelliculaires. La nature lipidique exacte des membranes de l'apicoplaste reste à définir. Le nombre exact de membranes entourant l'apicoplaste est l'objet de polémiques. Si un consensus porte le nombre de membranes apicoplastiques à quatre chez le parasite Apicomplexe *Toxoplasma gondii* ([Kohler et al., 1997](#)), il semble, en revanche, que l'apicoplaste de *Plasmodium falciparum* ne soit limité que par trois membranes ([Hopkins et al., 1999](#)). La membrane la plus externe de l'apicoplaste est vraisemblablement de type endomembranaire ([van Dooren et al., 2000](#)) connectée au système vésiculaire ([voir plus haut](#)). Les deux membranes les plus internes de l'apicoplaste sont supposées similaires aux deux membranes entourant le chloroplaste des algues et des plantes (l'enveloppe plastidiale).

À l'instar du plaste végétal, le stroma de l'apicoplaste contient une machinerie de synthèse des acides gras (Fatty Acid Synthase de type II ou FAS II) et produit des acyl-ACP (pour Acyl Carrier Protein). Des acyltransférases ayant les séquences d'adressage apicoplastidiales, sont détectées dans le génome, et permettent de générer du monoacyl et du diacylglycérol-phosphate (ou acide phosphatidique). L'apicoplaste est aussi impliqué dans la synthèse de lipides ne dérivant pas des acides gras tels que des isoprénoïdes ([Figure 11](#)). L'apicoplaste apparaît donc comme un site alternatif et/ou complémentaire du réticulum endoplasmique pour la néosynthèse de glycérolipides.

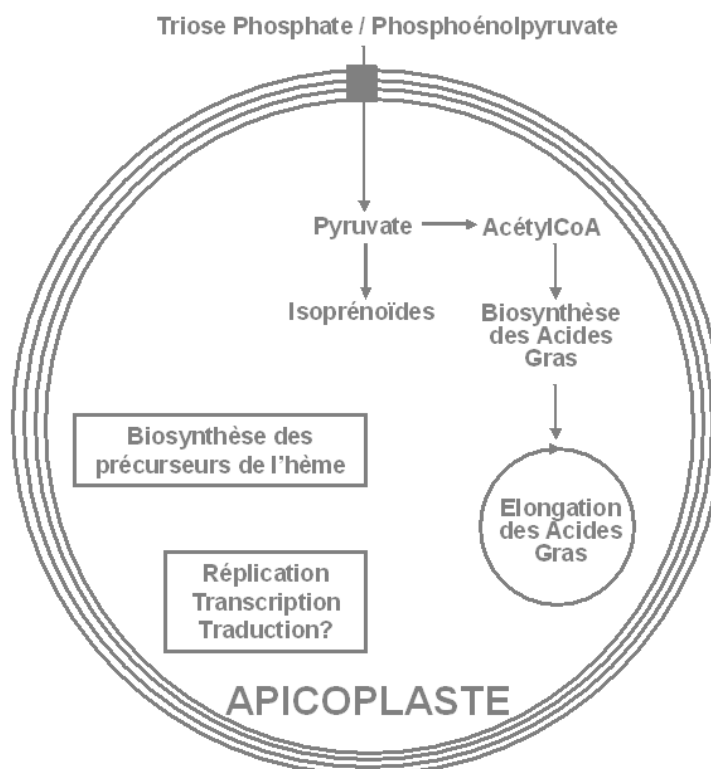


Figure 11 : Voies de biosynthèse présentes dans l'apicoplaste de *Plasmodium falciparum*. Les particularités biochimiques de l'apicoplaste sont la présence de voies de synthèses propres aux végétaux/procaryotes, notamment la synthèse d'isoprénoides par la voie indépendante du mévalonate, la synthèse d'acides gras par le système FASII, la synthèse des précurseurs de l'hème et la synthèse des protéines, propre aux organites autonomes.

B. Le globule rouge infecté : une compartimentation membranaire induite

Le globule rouge infecté se distingue du globule rouge non infecté par une organisation membranaire particulière, caractérisée d'une part par une modification de la membrane plasmique érythrocytaire, et d'autre part par la présence de divers compartiments délimités par des membranes dont la production est directement gouvernée par le parasite (Figure 9) (Deutsch and Wellem, 1996).

1. La membrane plasmique érythrocytaire

La membrane érythrocytaire comporte des microdomaines résistants aux détergents (ou radeaux lipidiques). Ces radeaux ont une composition particulière (ils sont notamment riches en cholestérol et en sphingolipides et s'associent à des protéines à ancrage GPI). Il semble que ces radeaux soient recrutés par le parasite, ce qui permet de fournir la vacuole parasitophore en cholestérol et protéines de surface érythrocytaires (Lauer *et al.*, 2000; Haldar *et al.*, 2002).

La membrane plasmique de l'érythrocyte infecté présente des protubérances (knobs) à sa surface. Les knobs sont visibles aux stades trophozoïte et schizonte (leur développement maximal intervenant au stade schizonte). Ces protubérances de 30 à 40 nm (Tilley *et al.*, 2008) constituent des plateformes contenant des protéines impliquées dans la cytoadhésion comme PfEMP1 et sont associées au cytosquelette membranaire.

2. La vacuole parasitophore

La vacuole parasitophore se constitue au cours de l'invasion du globule rouge par invagination de la membrane érythrocytaire (Haldar, 1996). Elle contient donc du matériel dérivé de l'érythrocyte, la cellule hôte et du matériel provenant de la sécrétion des organites du complexe apical (notamment des rhoptries). La vacuole parasitophore s'étend considérablement au cours du développement du parasite et montre une richesse en cholestérol (recruté depuis les radeaux vers la membrane de la vacuole parasitophore).

La vacuole parasitophore constitue une zone de transit incontournable pour les protéines exportées depuis le parasite vers le globule rouge (Cooke *et al.*, 2004). Cet export suit une voie de sécrétion classique *via* des vésicules recouvertes qui fusionnent avec la membrane plasmique. Le passage de la membrane de la vacuole parasitophore pourrait quant à lui être assuré par un transporteur de type ABC.

3. Le réseau tubulo-vésiculaire

Le réseau tubulo-vésiculaire (RTV) émane de la membrane de la vacuole parasitophore. Il est élaboré suite à un export de matériels lipidique et protéique par le parasite dans le cytoplasme du globule rouge. Il est impliqué dans l'import de divers nutriments (dont les nucléosides et les acides aminés) ainsi que de protéines et dans le recrutement de cholestérol. La sphingomyéline synthase, une protéine d'origine golgienne, semble notamment synthétisée au cours de la schizogonie puis exportée lors de remaniements golgiens entre les stades mérozoïte et anneau, qui apparaît essentielle à la mise en place du RTV (Elmendorf and Haldar, 1994).

4. Les structures de Maurer

Ces structures vésiculaires portent le nom de Georg Maurer, qui les a observées pour la première fois en microscopie photonique en 1902. Elles prennent la forme d'empilement de citernes membranaires (de 0,2 à 0,4 μm de long) présents dans le cytoplasme des érythrocytes infectés. Les structures de Maurer sont notamment visibles au stade trophozoïte. D'architecture complexe, elles sont délimitées par une simple bicouche lipidique, elle-même doublée d'un manteau protéique. Les structures de Maurer jouent un rôle essentiel en tant que compartiment intermédiaire dans le trafic des protéines parasitaires exportées vers la membrane plasmique du globule rouge (Lanzer *et al.*, 2006) et pourraient représenter l'équivalent d'un appareil de Golgi extra-parasitaire (Tilley *et al.*, 2008).

Certaines sont connectées au feuillet interne de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire, tandis que d'autres semblent connectées à la membrane de la vacuole parasitophore (Frischknecht and Lanzer, 2008).

C. Dynamique membranaire au cours du cycle parasitaire érythrocytaire

1. Au cours de l'invasion

Le processus d'invasion du globule rouge par le parasite commence par la reconnaissance et l'identification de la cellule hôte et son attachement irréversible par des molécules du manteau du mérozoïte. Il se poursuit par la réorientation du mérozoïte qui aligne son pôle apical avec la

membrane érythrocytaire, l'adhésion irréversible des membranes par jonction serrée (Figure 9 ①) et l'extrusion des organites apicaux du mérozoïte.

C'est alors que commence la phase d'entrée du parasite, au cours de laquelle le mérozoïte (de façon similaire au sporozoïte lors de l'invasion des cellules hépatiques) transfère du matériel sécrétoire de son complexe apical vers le globule rouge. Cette étape consiste en la décharge séquentielle de vésicules situées dans la région de la proéminence apicale du parasite : les micronèmes, les rhoptries puis les granules denses. Elle se poursuit par l'évolution de la jonction serrée en jonction mobile (Figure 12 ②). Cette jonction mobile forme un anneau en circonférence du parasite, qui se déplace par un mouvement antéro-postérieur depuis le pôle apical vers le pôle basal le long de la membrane plasmique du mérozoïte (Figure 12 ③) (Aikawa *et al.*, 1978). Conjointement au mouvement de la jonction, l'invagination de la membrane de la cellule hôte a lieu et se poursuit au fur et à mesure de l'avancée du parasite, autorisant son entrée dans le globule rouge (Figure 12 ④ et ⑤). Cette invagination épouse la forme du mérozoïte et résulte dans la formation progressive de la vacuole parasitophore, qui est délimitée par la jonction mobile, en regard du pôle apical de celui-ci. Il est à noter qu'au cours de l'invasion, le mérozoïte perd son manteau de surface (partie I A 1).

Suite à l'entrée du mérozoïte dans le globule rouge, la jonction avance (Figure 12 ⑥) jusqu'à ne laisser qu'un orifice correspondant au point d'entrée du parasite (Figure 12 ⑦). Lorsque le parasite est complètement entré au sein du globule rouge, la jonction semble fusionner à l'extrémité postérieure de celui-ci, scellant l'orifice en une jonction serrée unique (Figure 12 ⑧). À ce stade, la membrane parasitaire est encore en relation étroite avec la membrane érythrocytaire. La continuité de la vacuole parasitophore, au sein de laquelle va se développer le parasite, est ensuite assurée.

Au long de l'invasion, le pôle apical du parasite reste apposé à la membrane du globule rouge, en continuité avec un canal, formant une embouchure commune à l'extrémité des rhoptries, facilitant leur extrusion.

La membrane parasitophore relève donc à la fois de la membrane plasmique globulaire et des membranes ou éléments membranaires apicaux du parasite (Haldar, 1996). Les lipides de la cellule hôte sont incorporés dans la membrane de la vacuole parasitophore (et dans la membrane plasmique du parasite). Il en résulte une différence de composition de ces membranes par rapport aux membranes internes du parasite (Dluzewski *et al.*, 1995).

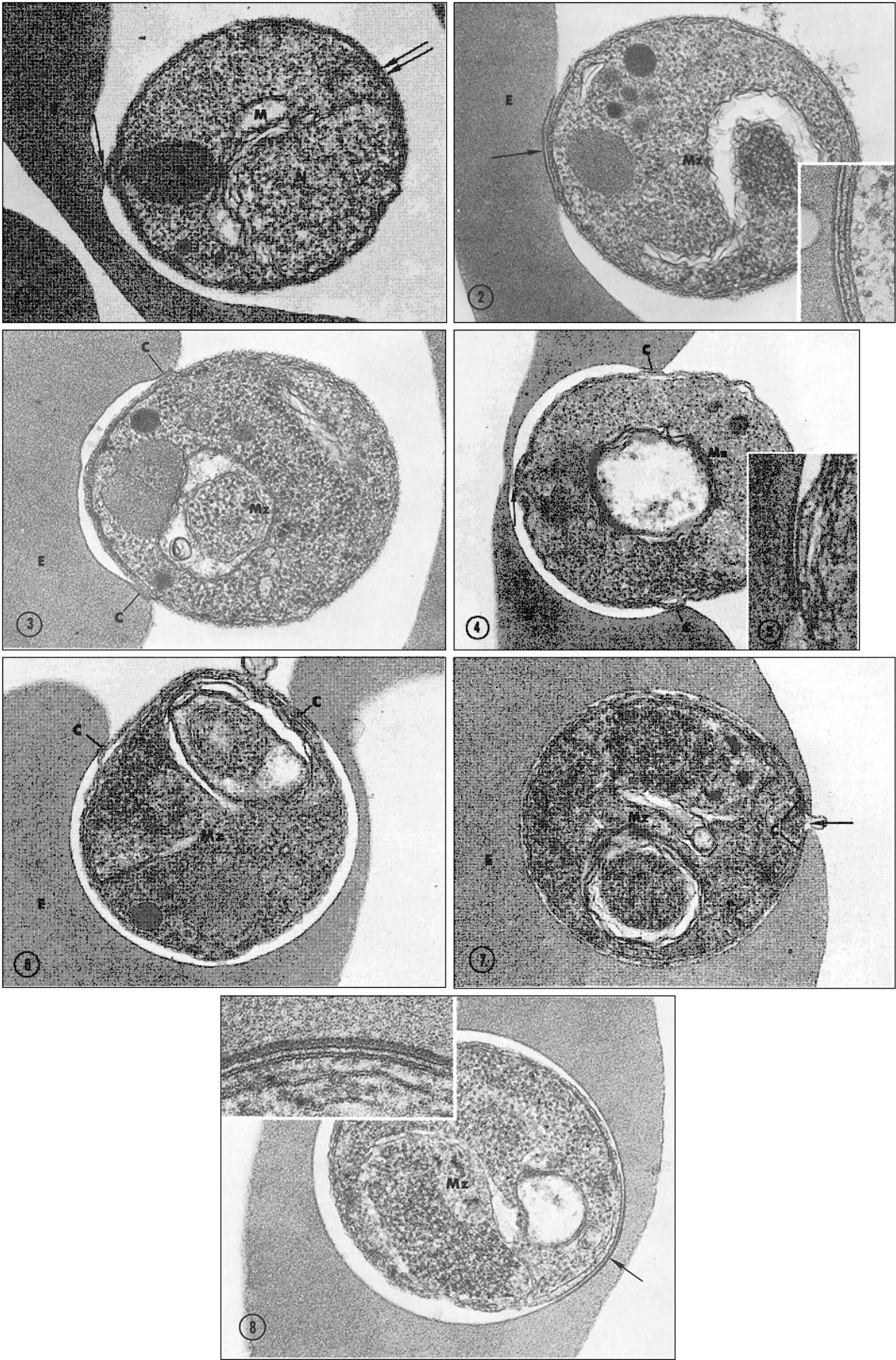


Figure 12 : Évolution de la jonction mobile observée en microscopie électronique entre un globule rouge et un mérozoïte de l'espèce *Plasmodium knowlesi*. (1) Contact irréversible entre le pôle apical du mérozoïte et la membrane d'un globule rouge. La simple flèche indique le point de contact. (2) Épaississement de la membrane du globule rouge correspondant à l'établissement de la jonction serrée. (3) Entrée du mérozoïte avec invagination de la membrane érythrocytaire. En (c), on observe les points d'ancrage visibles en coupe que constitue la jonction mobile. (4) Stade avancé d'entrée du mérozoïte dans le globule rouge : l'invagination du globule rouge s'accroît et sa forme épouse celle du globule rouge. Une plaque dense aux électrons, indiquée par simple flèche semble connecter le pôle apical du mérozoïte à la membrane érythrocytaire. (5) Agrandissement de la jonction. (6) La jonction (c) est à l'orifice d'entrée dans le globule rouge, au niveau de la région postérieure du mérozoïte. (7) Phase terminale du processus d'invasion : un petit orifice est observé à l'extrémité postérieure du mérozoïte. (8) À l'issue de l'invasion, le mérozoïte est intégralement internalisé dans le globule rouge. Sa partie postérieure adhère encore par jonction serrée à la membrane du globule rouge comme l'indique la flèche, tandis que le reste du mérozoïte se trouve en regard de la lumière de la vacuole parasitophore non achevée. E, érythrocyte; A, pôle apical; R, rhoptrie; M, mitochondrie; Mz, mérozoïte; N, noyau (Aikawa *et al.*, 1978).

2. Au cours du développement en stade anneau

Le parasite en stade anneau se présente initialement sous la forme d'un disque biconcave qui se replie sur lui-même, emprisonnant ainsi du cytoplasme érythrocytaire, qui constitue la « première gorgée » d'hémoglobine et donne sa forme caractéristique d'anneau (Elliott *et al.*, 2008). À ce stade qui fait directement suite à l'invasion du globule rouge par le mérozoïte, le parasite poursuit son développement au sein de la membrane parasitophore. Lors des premières 24 h post-invasion, le parasite en stade anneau, confiné dans la membrane parasitophore, induit l'élaboration d'un réseau tubulo-vésiculaire au sein du cytoplasme de la cellule hôte (absent chez les globules rouges non infectés).

Le réseau tubulo-vésiculaire est composé d'extensions et de replis membranaires issus de la vacuole parasitophore. L'inhibition de la sphingomyéline synthase (protéine exportée depuis l'appareil de Golgi à l'intérieur du parasite vers le réseau tubulo-vésiculaire à l'extérieur du parasite au cours des stades anneau et trophozoïte) affecte la formation du réseau tubulo-vésiculaire (Lauer *et al.*, 1995) et montre de ce fait l'importance de la sphingomyéline dans l'établissement de ce compartiment membranaire extra-parasitaire.

Au cours du stade anneau, le réticulum endoplasmique granuleux, tapissé de ribosomes prolifère du fait de la synthèse accrue de protéines associées aux membranes en formation.

Les structures de Maurer sont observées dans le cytoplasme de globules rouges infectés par des parasites à partir du stade anneau. La biogenèse des structures de Maurer n'a pas été élucidée (Spycher *et al.*, 2006) et leur origine tubulo-vésiculaire n'a pas pu être établie. Des études récentes semblent indiquer une composition membranaire distincte du réseau tubulo-vésiculaire ainsi que l'absence de toute continuité entre ces deux compartiments (Tilley *et al.*, 2008).

Le réseau tubulo-vésiculaire et les structures de Maurer persistent jusqu'à la différenciation des mérozoïtes (Haldar *et al.*, 2002), c'est à dire jusqu'au stade schizonte.

3. Au cours du développement en stade trophozoïte

Le parasite en anneau poursuit son cycle en évoluant en trophozoïte dont l'activité principale est la digestion d'hémoglobine et la biosynthèse de macromolécules. À ce stade le réseau tubulo-vésiculaire se développe et se complexifie. Il en résulte une teneur importante de phospholipides au

sein du globule rouge infecté par le trophozoïte (six fois la quantité habituelle de phospholipides contenus dans les membranes érythrocytaires).

Au stade trophozoïte, la vacuole digestive apparaît dans le cytoplasme du parasite (Elliott *et al.*, 2008). Cette vacuole digestive s'est constituée suite à l'emprisonnement de cytoplasme érythrocytaire lors du repliement du parasite sur lui-même, alors que commence le processus de digestion de l'hémoglobine par des protéases. Le réseau tubulo-vésiculaire autorise l'import de divers nutriments (dont les nucléosides et les acides aminés) ainsi que de protéines et de cholestérol (Lauer *et al.*, 1997; Lauer *et al.*, 2000). Il apparaît donc comme un compartiment charnière entre le parasite et le milieu extracellulaire. Le stade trophozoïte est aussi un stade de remaniement spectaculaire au niveau de la membrane plasmique du globule rouge. On observe notamment les protrusions membranaires (knobs) qui correspondent à des îlots protéiques en surface de la membrane érythrocytaire (voir plus haut).

4. Au cours du développement au stade schizonte

Le parasite passe d'une activité trophique à une activité de synthèse et d'assemblage des composants du mérozoïte. Le noyau subit 4 cycles de divisions, produisant 16 noyaux de mérozoïtes en développement. Les organites du complexe apical sont formés à partir du Golgi. Au cours de ce stade schizonte (lors des 10-12 dernières heures de développement du parasite), la biogenèse des organites apicaux nécessaires à la prochaine invasion, a lieu chez les mérozoïtes en développement (Margos *et al.*, 2004). L'apicoplaste puis la mitochondrie se divisent (van Dooren *et al.*, 2005). La segmentation des 16 mérozoïtes par cytodierèse est tardive dans le schizonte : ces processus nécessitent eux aussi une forte biosynthèse de lipides.

Les acides gras libres, résultant de la dégradation progressive du triacylglycérol au cours de la division schizogonique joueraient un rôle dans le processus de rupture du schizonte libérant ses mérozoïtes infectieux (Palacpac *et al.*, 2004). Le processus de rupture aboutit à la libération de 16 mérozoïtes d'une remarquable simplicité, de tailles minimales et possédant des organites réduits. Le corps résiduel, qui correspond à la vacuole digestive chargée de cristaux d'hémozoïne, est libéré, lui aussi, dans le milieu.

5. Au cours du développement au stade gamétocyte

Au cours du développement du gamétocyte, des changements morphologiques s'opèrent dont la formation de la pellicule semblable à celle observée chez le mérozoïte, mais naturellement plus développée (voir partie I A 1 b). Son développement est asymétrique, ce qui donne une forme en D au gamétocyte au stade II-III. La symétrie est restaurée en stade IV lorsque la pellicule entoure complètement le parasite. Celle-ci est constituée de trois membranes : la membrane plasmique, et la membrane (coté cytoplasmique et côté membrane plasmique) de vésicules aplaties situées longitudinalement sous la membrane plasmique. Elle est sous-tendue de microtubules dont le développement est concomitant au développement de la pellicule, mais qui disparaissent du fait de leur dépolymérisation en stade V. Il est à noter que le gamétocyte femelle contient plus de mitochondries, plus de ribosomes et un réticulum endoplasmique plus développé que le mâle. Le

noyau du gamétocyte mâle se différencie de celui du gamétocyte femelle au cours du développement : il est plus gros et plurilobé. L'hémozoïne produite par le parasite n'est pas contenue dans une unique vacuole digestive mais dans de nombreuses vésicules.

D. Composition lipidique des membranes de *Plasmodium falciparum*

La composition lipidique de *Plasmodium falciparum*, ainsi que son métabolisme et sa dynamique, ne peuvent être envisagés indépendamment de la relation parasitaire, et en particulier du statut lipidique de la cellule hôte. Il est par ailleurs très difficile de fractionner les compartiments membranaires du parasite, justifiant les connaissances assez fragmentaires relatives à sa composition fine des lipides chez *P. falciparum*. Des études anciennes ont défini la composition lipidique (en particulier en acides gras et phospholipides) des membrane du globule rouge humain sain (Dodge and Phillips, 1967). Dans le globule rouge non infecté, les phospholipides et le cholestérol sont les lipides majoritaires. Parmi ces phospholipides, les plus représentés sont la phosphatidylcholine (PC, 30 à 35% des phospholipides environ), la phosphatidyléthanolamine (PE, 25 à 30%), la sphingomyéline (SM, 25 à 30%) et la phosphatidylsérine (PS, 10 à 15%). Les autres espèces de phospholipides (phosphatidylinositol PI, acide phosphatidique AP, cardiolipide ou diphosphatidylglycérol DPG et lysophosphatidylcholine LPC) représentent chacune moins de 2% des phospholipides totaux (Tableau 3).

La composition lipidique de la membrane plasmique érythrocytaire révèle par ailleurs une asymétrie de répartition entre les feuillet interne et externe de la bicouche phospholipidique constituant la membrane plasmique du globule rouge (Op den Kamp, 1979). Ainsi, le feuillet cytoplasmique de la bicouche apparaît préférentiellement enrichi en PE, PS et PI, tandis que le feuillet exoplasmique apparaît, lui, préférentiellement enrichi en PC, SM, cholestérol et glycolipides.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'invasion du globule rouge par le parasite *Plasmodium falciparum* et le développement de ce dernier s'accompagnent de nombreux remaniements membranaires de la cellule hôte et du parasite.

L'analyse du contenu phospholipidique de la seule membrane plasmique érythrocytaire montre une distribution inchangée avant et après infection. Cependant, un remaniement de la distribution des lipides a lieu d'un feuillet à l'autre, comme le révèle la différence de composition phospholipidique différentes entre les deux feuillets (Schwartz et al., 1987; Moll et al., 1988). Le feuillet exoplasmique contient une quantité augmentée de PE et de PS mais une quantité diminuée de PC au cours des stades matures de développement (trophozoïte, schizonte). Ces remaniements sont indépendants de la présence ou de l'absence de protubérances.

La composition lipidique des membranes du parasite *Plasmodium* et du globule rouge infecté par rapport au globule rouge non infecté a été étudiée chez divers espèces parasitaires : *Plasmodium knowlesi* (Beaumelle and Vial, 1986), *Plasmodium chabaudi* (Simoes et al., 1993) et *Plasmodium falciparum* (Hsiao et al., 1991), depuis la mise au point du maintien de cultures *in vitro*. La composition des membranes générées par le parasite est enrichie en PC et PE, et appauvrie en cholestérol, PS et SM en comparaison de la composition des membranes de la cellule hôte (Vial et al., 2003). Une

augmentation de la quantité de phospholipides (pouvant atteindre un facteur 6) par rapport à la quantité initiale a lieu au cours du cycle érythrocytaire du parasite (Beaumelle and Vial, 1986).

	Composition en phospholipides (en % des phospholipides totaux)							
	PC	PE	SM	PS	PI	PA	DPG	LPC
Globules rouges non infectés	31,7±2,1	27,1±2,3	28,0±1,2	11,7±0,4	0,8±0,4	1,4±0,5	0,0	0,8±0,4
MP de globules rouges infectés	38,7±3,2	25,0±3,3	14,6±2,6	9,2±3,1	2,1±0,9	1,6±0,7	0,0	1,5±0,9
Parasites <i>P. falciparum</i> libres	56,7±2,0	26,8±2,1	5,7±1,4	4,0±1,0	2,7±0,6	<0,1	5,5±0,5	<0,1

Tableau 3: Compositions phospholipidiques comparées de membranes plasmiques de globules rouges non infectés, de membranes de globules rouges parasités par *P. falciparum* et de parasites libres (Hsiao et al., 1991). PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; SM, sphingomyéline ; PS, phosphatidylsérine ; PI, phosphatidylinositol ; PA, acide phosphatidique ; DPG, diphosphatidylglycérol ou cardiolipide ; LPC, lysophosphatidylcholine.

L'analyse du contenu lipidique des membranes de parasites libres (Tableau 3) identifie la PC (plus de 50% des phospholipides totaux) et la PE (entre 25 et 30% des phospholipides totaux) comme les composants phospholipidiques majoritaires. Les membranes parasitaires sont donc des membranes eucaryotes inhabituelles dans le sens où elles ne renferment que peu de SM et de PS et peu ou pas de cholestérol.

Outre l'augmentation spectaculaire de la teneur des globules rouges infectés en phospholipides, une augmentation notable des DAG (diacylglycérols), TAG (triacylglycérols) et des lipides neutres en général est observée.

Chez le globule rouge sain, la plupart des acides gras et des lipides neutres sont à la limite de détection par les méthodes conventionnelles (Dodge and Phillips, 1967). Mais dès l'invasion par *Plasmodium falciparum*, l'accroissement de lipides neutres totaux (qui incluent les acides gras, DAG et le TAG) est significatif (Vial and Ben Mamoun, 2005), vraisemblablement du fait de synthèses *de novo*.

Les lipides indispensables à la croissance rapide du parasite intracellulaire, ont deux sources possibles : soit ils sont importés depuis la cellule hôte (le globule rouge), soit ils dérivent d'intermédiaires de synthèse importés ou ils sont synthétisés *de novo*.

II. Synthèse et dynamique des acyl-lipides chez *Plasmodium falciparum*

Les lipides ont été définis comme étant les corps gras qui composent le Vivant. Leur propriété physico-chimique d'hydrophobicité peut être portée par une grande diversité structurale. Cette diversité s'étend de molécules compactes polycycliques telles que les stérols, aux longues chaînes de carbones telles que les dérivés des acides gras ou des isoprénoïdes.

Les lipides sont dits *polaires* lorsqu'ils sont amphiphiles, c'est-à-dire lorsqu'ils possèdent une partie hydrophile (souvent appelée « tête » hydrophile) et une partie hydrophobe (souvent appelée « queue » hydrophobe). Les lipides polaires sont les composants essentiels qui structurent les

membranes biologiques, sous forme d'une bicouche très dynamique dans laquelle s'insèrent des protéines selon le modèle de la mosaïque fluide (Singer and Nicolson, 1972). Les lipides n'ont pas uniquement un rôle structural pour la compartimentation cellulaire. Ils possèdent également d'autres fonctions vitales : ils sont précurseurs métaboliques, servent pour le stockage de l'énergie et représentent d'importantes molécules de signalisation (Dowhan and Bogdanov, 2002; Eyster, 2007).

Au delà de la diversité structurale (et métabolique) qui les caractérise, les glycérolipides et les sphingolipides sont avec les stérols les composants majeurs structurant les membranes. Glycéro- et sphingolipides sont avec les thioesters simples acyl-S-ACP et acyl-S-CoA collectivement qualifiés d'acyl-lipides, car ils comportent des groupements dérivés des acides gras. Les acyl-lipides sont plus particulièrement traités dans ce chapitre. La plupart des acyl-lipides membranaires sont constitués d'acyls liés (i) *via* une liaison ester ou éther, à un trialcool, le glycérol (formation de glycérolipides); (ii) *via* une liaison amide à des bases sphingoides (céramides, sphingolipides et gangliosides) ou plus rarement à des amines.

A. Synthèse des acyls-lipides

1. Synthèse des acides gras

a) Définition et nomenclature

• Définition

Les acides gras sont des acides carboxyliques comportant une chaîne aliphatique de longueur variable. Cette chaîne de carbones peut être simple (saturée ou insaturée), ou encore modifiée par différentes substitutions (méthylations, oxydations, cyclisations). À ce jour, plus d'un millier d'acides gras naturels ont été décrits [The Lipid Library, <http://www.lipidlibrary.co.uk/>].

• Nomenclature des acides gras simples

Les acides gras simples peuvent être classés en 3 grands groupes structuraux : les *acides gras saturés* (ne possédant pas de double liaison) et les *acides gras mono-* et *poly-insaturés*. Chaque acide gras peut être distingué par :

- un nom systématique, issu de la (stéréo)chimie de sa structure ;
- un nom trivial, le plus souvent en rapport avec sa découverte ;
- un nom raccourci, donnant les caractéristiques structurales principales (voir Tableau 4).

Les acides gras les plus rencontrés dans les cellules eucaryotes ont une taille variant de 16 à 18 carbones et comprennent de 0 à 3 insaturations. Ces insaturations sont soit en conformation *cis*, soit en conformation *trans*, ce qui confère une structure spécifique à l'acide gras qui les porte. Certains acides gras poly-insaturés sont dits essentiels, c'est-à-dire que l'organisme est incapable de les synthétiser *de novo* ; un apport par le régime alimentaire est donc indispensable. Ce terme ne s'applique qu'aux animaux puisque les végétaux sont autonomes pour la synthèse de l'ensemble des acides gras.

Les acides gras saturés : Les machineries de biosynthèse d'acides gras produisent majoritairement l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0) qui sont de fait les acides gras saturés les plus abondants.

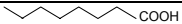
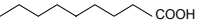
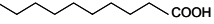
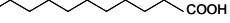

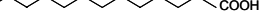






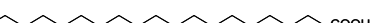


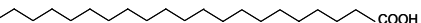

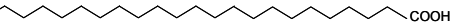


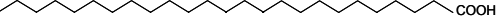





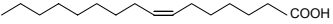

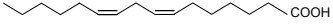
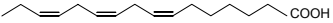
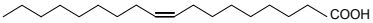
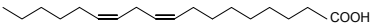
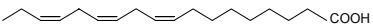
	Nom systématique	Nom trivial	Désignation raccourcie
Acides gras saturés			
	octanoïque	Caprylique	8:0
	nonanoïque		9:0
	décanoïque	Caprique	10:0
	undécanoïque		11:0
	dodécanoïque	Laurique	12:0
	tridécanoïque		13:0
	tetradécanoïque	Myristique	14:0
	pentadécanoïque		15:0
	hexadécanoïque	Palmitique	16:0
	heptadécanoïque	Margarique	17:0
	octadécanoïque	Stéarique	18:0
	nonadécanoïque		19:0
	eicosanoïque	Arachidique	20:0
	henéicosanoïque		21:0
	docosanoïque	Béhénique	22:0
	tricosanoïque		23:0
	tétracosanoïque	Lignocérique	24:0
	pentacosanoïque		25:0
	hexacosanoïque		26:0
	heptacosanoïque		27:0
	octacosanoïque		28:0
	nonacosanoïque		29:0
	triacontanoïque		30:0
	hentriacontanoïque		31:0
	dotriacontanoïque		32:0
Acides gras insaturés			
	<i>cis</i> -9- hexadécénoïque	Palmitoléique (graisse de baleine)	16:1
	<i>cis</i> -7- hexadécénoïque	≠Palmitoléique (lipides de plantes)	16:1
	<i>trans</i> -3- hexadécénoïque	≠Palmitoléique (groupement acyl du PG chez les plantes)	16:1t
	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10- hexadécadiénoïque		16:2
	<i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13- hexadécatriénoïque		16:3
	<i>cis</i> -9- octadécénoïque	Oléique	18:1
	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12- octadécadiénoïque	Linoléique	18:2
	9- <i>cis</i> ,12- <i>cis</i> ,15- <i>cis</i> - octadécatriénoïque	αLinoléique	18:3

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des principaux acides gras simples, saturés et insaturés, rencontrés chez les eucaryotes. La désignation raccourcie indique en premier chiffre, la longueur de la chaîne aliphatique et en deuxième, le nombre d'insaturations portées.

Les acides gras insaturés : Les acides gras insaturés sont majoritairement des acides gras en C18 et en C16 (acides gras ubiquitaires). L'acide oléique (*cis*-9-C18:1) est de loin, le plus abondant dans les lipides structuraux de cellules animales et végétales. Les acides gras poly-insaturés les plus courants sont les acides linoléique (C18:2) et α -linoléique (C18:3), essentiels pour les cellules animales. La désaturation de l'acide palmitique (C16:0) peut conduire à l'introduction d'une double liaison à des positions différentes chez les animaux (acide palmitoïque, *cis*-9-C16:1) et les plantes (groupement *cis*-7-C16:1 des galactolipides ou *trans*-3-C16:1t du phosphatidylglycérol). La notation C16:1t permet de désigner ce dernier, alors que la notation C16:1 est ambiguë (voir Tableau 4). La détermination des profils d'acides gras d'extraits biologiques nécessite une analyse extrêmement fine (par méthodes couplant spectroscopie infra-rouge, chromatographie phase gazeuse, chromatographie couche mince, chromatographie liquide, spectrométrie de masse) (Ledoux *et al.*, 2000) afin de distinguer ces isomères.

Il n'est par exemple, pas encore établi si certains organismes tels que les Apicomplexes, qui présentent des structures végétales, contiennent des acides gras de type *cis*-7-C16:1 ou *trans*-3-C16:1t.

Les acides gras substitués : Les acides gras peuvent subir de multiples transformations telles que des branchements de groupes aliphatiques (Dembitsky *et al.*, 2003), des couplages avec des isoprénoides, des cyclisations et/ou des oxydations. De telles transformations sont fréquentes chez les plantes (Smith, 1971).

Les acides gras retrouvés le plus fréquemment chez *Plasmodium* sont l'acide palmitique, l'acide stéarique l'acide oléique et l'acide linoléique (Beaumelle and Vial, 1986).

b) Biosynthèse des acides gras

- Synthèse des acides gras par le système FASII

Le site de production des acides gras chez *Plasmodium*, comme chez la plupart des Apicomplexes (à l'exception de *Cryptosporidium*), est l'apicoplaste. La voie de biosynthèse des acides gras dans l'apicoplaste est de type FASII, caractéristique des végétaux, des algues, comme de certaines bactéries. Les acides gras synthétisés sont des acides gras à chaînes carbonées courtes de longueurs C10, C12 et C14 (Surolia and Surolia, 2001).

Le principal substrat carboné de la voie de biosynthèse des acides gras est l'acétyl-CoA (voir Figure 13). Ce dernier est métabolisé dans l'apicoplaste de deux façons : à partir d'acétate importé dans le plaste et sous l'action d'une acétyl-CoA synthétase, ou bien à partir de phosphoénolpyruvate (PEP), après action d'une pyruvate kinase puis d'un complexe pyruvate déshydrogénase (Ralph *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'entrée d'acétyl-CoA dans le plaste *via* un transporteur peptide:acétyl-CoA putatif a été proposée. Cette hypothèse est appuyée par l'identification d'un gène codant pour un transporteur de ce type *in silico* (accession ATCC PF10_0360) (Martin *et al.*, 2005). Toutefois, ni la localisation ni le rôle fonctionnel de ce transporteur potentiel n'ont été caractérisés. On peut noter que l'analyse de la séquence protéique correspondant au produit du gène PF10_0360, au moyen de l'outil PlasmoAP (Foth *et al.*, 2003) révèle la présence d'un signal d'adressage apicoplastique qui, étrangement, n'est pas précédé d'un peptide signal permettant l'entrée dans le système

endomembranaire. La réalité de l'expression de ce gène et de l'adressage de la protéine correspondante reste ouverte.

Dans le système FASII, la réaction de synthèse des acides gras s'effectue en deux étapes : une phase d'initiation, résultat de la condensation d'un groupement malonyl, dont l'origine est fournie par le malonyl-ACP (synthétisé à partir de malonyl-CoA), avec un acétyl-CoA, et une phase d'élongation correspondant à l'ajout de deux carbones par le donneur malonyl-CoA le tout suivi de diverses réactions (réduction, déshydratation, réduction) assurées par un ensemble d'enzymes identique à celui décrit chez les procaryotes (Figure 13) [Pour revue : (Surolia *et al.*, 2004; Wilson, 2005)].

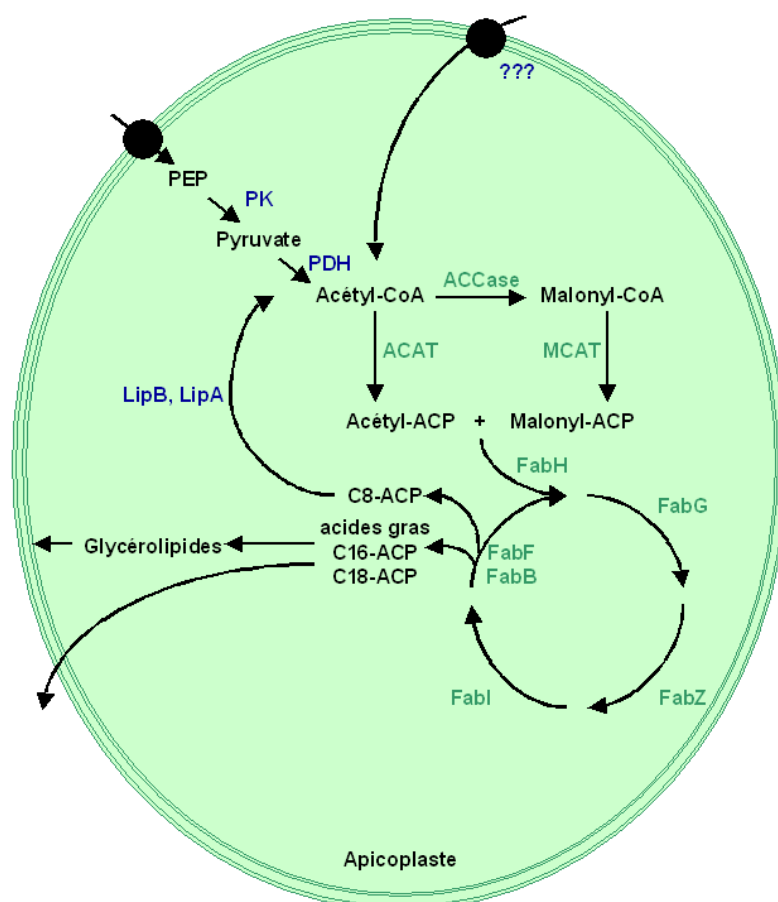


Figure 13 : Schéma de la voie de biosynthèse des acides gras par le système FASII dans l'apicoplaste. En vert sont représentées les enzymes catalysant les réactions de la voie de biosynthèse des acides gras. PEP, phosphoénolpyruvate ; PK, pyruvate kinase ; PDH, complexe pyruvate déshydrogénase ; ACCase, acétyl-CoA carboxylase ; ACP, Acyl Carrier Protein ; ACAT, acétyl-CoA :ACP transacylase ; MCAT, malonyl-CoA transacylase ; FabH, β -kétacyl-ACP synthase III ; FabG, β -kétacyl-ACP réductase ; FabZ, β -Hydroxyacyl-ACP réductase ; FabI, Enoyl-ACP réductase ; FabF / FabB, β -kétacyl-ACP synthase I / β -kétacyl-ACP synthase II ; LipB, lipoate protéine ligase ; LipA, acide lipoïque synthase.

Toutes les enzymes du système FASII semblent être présentes dans l'apicoplaste du parasite *Plasmodium* comme l'attestent des analyses *in silico* (Tableau 5). Ces enzymes sont codées par des gènes nucléaires du parasite, synthétisées dans le cytoplasme et importées à l'intérieur de l'apicoplaste par un système d'adressage (Foth *et al.*, 2003), détaillé ultérieurement (Partie II D 3).

Fonction protéique	EC	Accession ATCC	Chromosome
Acyl Carrier Protein (=ACP)		PFB0385w	MAL 2
β-kétoacylACPSynthase (=KAS ou KS)			
β-kétoacylACPSynthase I/II (FabF/B)	2.3.1.85	PFF1275c	MAL 6
β-kétoacylACPSynthase III (FabH)	2.3.1.41	PFB0505c	MAL 2
Enoyl-ACP reductase (=FabI ou ENR)	1.3.1.9	PFF0730c	MAL 6
Acétyl-coenzyme A carboxylase (=ACCase)	6.4.1.2	PF10_0409	MAL10
Domaine Biotine carboxylase	6.3.4.14	PF14_0664	MAL14
Domaine Carboxyltransferase			
Domaine Biotin Carboxyl Carrier	6.3.4.15	PF14_0573	MAL14
Acetyl-coenzymeA:ACP-transacylase (=ACAT)	2.3.1.38	PFB0505c	MAL 2
Malonyl-coenzymeA:ACP-transacylase (=FabD ou MCAT)	2.3.1.39	PF13_0066	MAL13
β-Ketoacyl-ACP Reductase (=FabG ou β-KAR)	1.1.1.100	PFI1125c	MAL9
β-Hydroxyacyl-ACP Reductase (=FabZ ou β-HAD)	4.2.1.-	PF13_0128	MAL13

Tableau 5 : Ensemble des gènes prédits pour contribuer à la voie de biosynthèse des acides gras par le système FASII dans l'apicoplaste (Roberts *et al.*, 2003; Gornicki, 2003).

- Autres voies de biosynthèse potentielle

Aucun système de type FASI cytosolique n'a pu être mis en évidence chez *Plasmodium falciparum* contrairement à *Eimeria tenella* (Lu *et al.*, 2007) ou *Toxoplasma gondii* (Bisanz *et al.*, 2006; Mazumdar *et al.*, 2006) chez qui coexistent les deux systèmes de biosynthèse des acides gras. Pour ces deux organismes ainsi que pour *Cryptosporidium* (chez qui aucun système FASII n'a pu être mis en évidence) (Zhu, 2004), la localisation du système FASI n'a pas été établie avec certitude mais par analogie avec les eucaryotes dotés d'un système FASI (levures, mammifères), il est vraisemblable que ce système soit cytosolique (Zhu *et al.*, 2000).

L'exploration de la banque de données PlasmoDB, utilisant comme requête des séquences d'élongases d'acides gras, permet d'identifier une séquence chez *Plasmodium knowlesi* (accession, PKH_071720), dont la fonction est hypothétique, basée sur son identité partielle avec des élongases d'acides gras à longues chaînes retrouvées chez divers organismes eucaryotes possédant un motif GNS1/SUR4. On retrouve deux protéines porteuses de tels motifs chez *Plasmodium falciparum* référencées dans la base PlasmoDB, sous les identifiants PFI0980w et PFA0455c (Tableau 6). L'annotation pour ces deux protéines, a récemment été modifiée dans la base PlasmoDB et les décrit désormais comme des élongases d'acide gras à longues chaînes putatives. L'existence de telles protéines conservées chez les parasites du genre *Plasmodium* pose la question de la présence d'un système d'élongation qui puisse aussi agir pour la synthèse *de novo* d'acides gras.

Organisme	Accession ATCC	Protéine
<i>Plasmodium falciparum</i>	PFA0455c	Protéine d'élongation d'acides gras, famille GNS1/SUR4, putative
<i>Plasmodium vivax</i>	Pv081320	Protéine 3 d'élongation de très longues chaînes d'acides gras, putative
<i>Plasmodium knowlesi</i>	PKH_020420	Protéine intégrale de membrane, famille GNS1/SUR4, putative
<i>Plasmodium berghei</i>	PB000448.02.0	Protéine intégrale de membrane, famille GNS1/SUR4, putative
<i>Plasmodium chabaudi</i>	PC105940.00.0	Protéine hypothétique
<i>Plasmodium yoelii</i>	PY03060	Produit protéique non dénommé, putatif
<i>Plasmodium falciparum</i>	PFI0980w	Enzyme d'élongation de longues chaînes d'acides gras, putative
<i>Plasmodium vivax</i>	Pv099415	Protéine contenant un domaine GNS1/SUR4
<i>Plasmodium knowlesi</i>	PKH_071720	Elongase d'acide gras, putative
<i>Plasmodium berghei</i>	PB300008.00.0	Protéine hypothétique conservée
<i>Plasmodium chabaudi</i>	PC001050.02.0	Protéine hypothétique conservée
<i>Plasmodium yoelii</i>	PY05248	Glycoprotéine de 30 kDa

Tableau 6 : Protéines prédites possédant un motif GNS1/SUR4. Les protéines de la famille GNS1/SUR4 sont des protéines intégrales des membranes qui assurent l'élongation d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne.

- Détournement de précurseurs issus de l'hôte

Une grande partie des acides gras peut aussi dériver de l'hôte et du sérum. En effet, il est connu que l'incubation de parasites en présence d'acides gras libres montre une incorporation dans les glycérolipides (Simoes *et al.*, 1992). Des acides gras de taille définitive, ou des acides gras courts dérivant de l'hôte pourraient donc être pris en charge par les élongases putatives, récemment identifiées par analyse génomique (voir plus haut), et allongés jusqu'à une taille compatible avec la biosynthèse de lipides pour les membranes du parasite. En complément de la néosynthèse d'acides gras par le système FAS II, une élongation de précurseurs courts issus de l'hôte reste toutefois à démontrer dans les conditions physiologiques. Il est cependant clair que cette voie ne peut pas se substituer totalement à la synthèse par FASII puisque de nombreux inhibiteurs de la synthèse d'acide gras plastidiale sont létaux.

2. Synthèse des glycérolipides

a) Définition et nomenclature

Les glycérolipides représentent la majorité des lipides membranaires. Ce sont des esters du glycérol, un trialcool (Figure 14 A) sur lequel un, deux ou trois hydroxyle(s) peuvent être liés à une chaîne d'acide gras *via* une liaison ester. La position des acyls sur le glycérol est notée suivant le système de nomenclature « stereospecific number » (*sn*) (Figure 14).

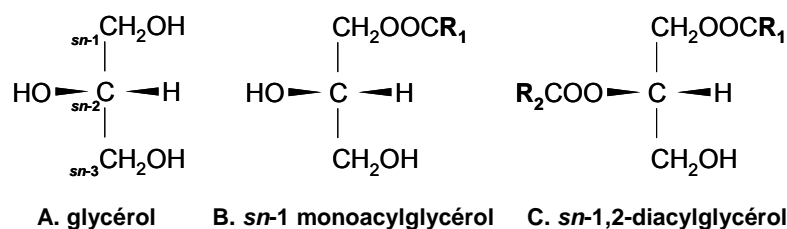


Figure 14 : Représentation de Fischer des acyl-glycérols comportant des acides gras estérifiés en position *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3 du glycérol. (A) Nomenclature *sn* ; (B) Exemple de *sn*-1-monoacylglycérol ; (C) Exemple de *sn*-1,2-diacylglycérol. R_1 et R_2 : deux groupements acyls.

En général, les lipides membranaires sont des glycérolipides formés d'un glycérol dont les positions *sn*-1 et *sn*-2 sont occupées par une chaîne d'acide gras ; ils portent par contre, une tête polaire en *sn*-3. Ils ont donc tous pour base commune le squelette du diacylglycérol (Figure 14 C).

b) Les précurseurs des glycérolipides membranaires

L'ensemble des glycérolipides membranaires est synthétisé à partir de l'acylation séquentielle du glycérol-3-phosphate issu de la glycolyse, ou chez *Plasmodium*, possiblement dérivé d'un intermédiaire glycérol importé de l'hôte *via* une aquaglycéroporine de la membrane plasmique (Hedfalk *et al.*, 2008), formant tout d'abord l'acide lysophosphatidique (lyso-AP) puis l'acide phosphatidique (AP). L'acide phosphatidique permet ensuite la synthèse du diacylglycérol (DAG) et du cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG). Ces 3 lipides constituent les intermédiaires nécessaires à la néosynthèse de l'ensemble des glycérolipides (Tableau 7).

Nom	Structure	Fonctions principales	Localisation
Acide phosphatidique (AP)		<ul style="list-style-type: none"> • Précurseur général de synthèse des glycérolipides (DAG et CDP-DAG) • Messenger intracellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Ubiquitaire, formé selon les besoins cellulaires.
Diacylglycérol (DAG)		<ul style="list-style-type: none"> • Précurseur pour la synthèse de glycérolipides phosphatés (PE, PC) ou non phosphatés (MGDG, DGDG, SQDG) • Messenger intracellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Formé selon les besoins cellulaires. • Présent dans les zones de courbures membranaires
Cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG)		<ul style="list-style-type: none"> • Précurseur pour la synthèse de phospholipides (PS, PE, PC, PG, DPG) 	<ul style="list-style-type: none"> • Réticulum, mitochondrie, plastes

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des principaux précurseurs des glycérolipides, l'acide phosphatidique, le diacylglycérol et le CDP-diacylglycérol.

La [Figure 15](#) résume l'ensemble des voies de biosynthèse des glycérolipides qui seront détaillées ci-dessous.

La première réaction d'acylation, responsable de la synthèse de lyso-AP, est catalysée par une acyl-CoA:glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT). La seconde réaction d'acylation, qui produit l'acide phosphatidique, est elle catalysée par une acyl-CoA:1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT).

Chez la plupart des organismes, le DAG est produit à partir de l'AP par une réaction de déphosphorylation catalysée par une acide phosphatidique (AP) phosphatase (PAP), dont il existe deux formes (PAP-1, Mg^{2+} dépendante et PAP-2, Mg^{2+} indépendante). Une enzyme de type PAP-2, vraisemblablement membranaire, a pu être identifiée *in silico* chez *Plasmodium falciparum* (accession PlasmoDB PFF1210w, récemment réannotée), mais à ce jour aucune activité PAP n'a encore été caractérisée formellement chez le parasite [pour revue ([Vial and Ben Mamoun, 2005](#))]. Son activité céramide cholinephosphotransférase l'implique dans le métabolisme de la sphingomyéline et des céramides.

Chez les eucaryotes, une voie alternative de synthèse de DAG est connue par acylation d'un monoacylglycérol. Cependant, *Plasmodium falciparum* ne semble pas posséder de gène codant pour une acyl-CoA:monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) qui ait une homologie détectable avec les séquences de MGAT mammifères, ce qui tend à souligner l'absence d'une telle voie métabolique chez le parasite.

Une phosphodiesterase putative (accession PlasmoDB PFL1870c) a été initialement impliqué chez *Plasmodium falciparum* dans l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et phosphocholine (cette enzyme est appelée à ce titre sphingomyélinase phosphodiesterase) ([Hanada et al., 2000](#)). L'hypothèse d'une activité phospholipase C d'hydrolyse du lysoPAF (facteur d'activation plaquettaire) et de la lyso-PC (libérant ainsi du DAG) a été avancée pour cette protéine chez *Plasmodium falciparum* ([Hanada et al., 2002](#)). En effet une telle activité a été montrée dans des fractions membranaires d'*E. coli* exprimant la protéine recombinante.

Un gène codant pour une phospholipase C putative, spécifique des phosphoinositides (accession PlasmoDB PF10_0132) a récemment été réannoté. La protéine que ce gène code pourrait être capable de catalyser la réaction d'hydrolyse du PI-4,5biphosphate (PIP_2) en inositol triphosphate (IP_3) et DAG. Le DAG ainsi produit jouerait plutôt un rôle dans un processus de signalisation.

L'AP et le DAG sont à l'origine de la majorité des glycérolipides membranaires (dont les phosphoglycérolipides, voir plus loin). Il est intéressant de noter que l'AP et le DAG sont aussi des molécules de signalisation dans de nombreux systèmes biologiques : leur accumulation transitoire a donc valeur de signal. De par leur importance en tant qu'intermédiaire métabolique et / ou de signal, ces deux lipides sont souvent indétectables dans les systèmes membranaires biologiques intacts.

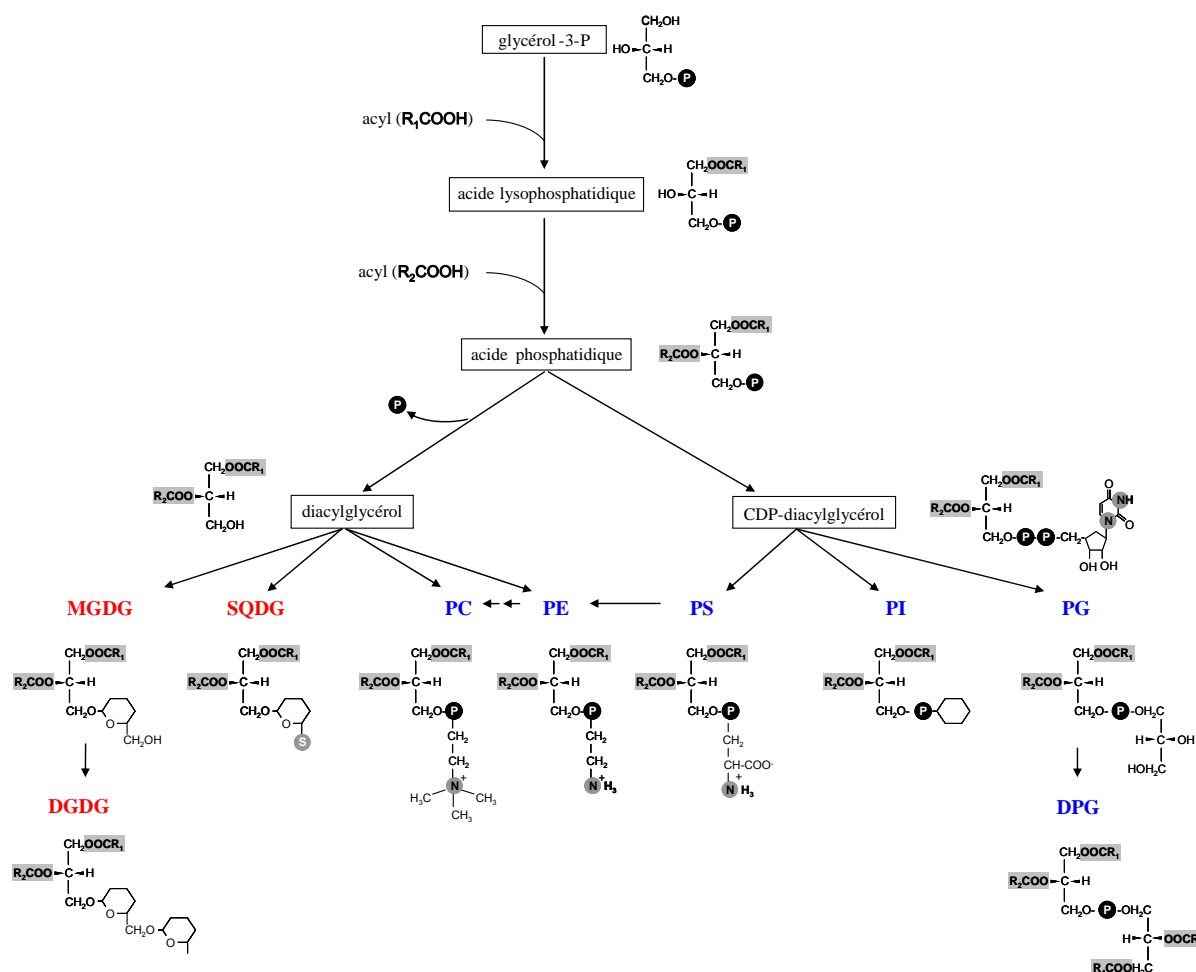


Figure 15 : Voies générales de synthèse des glycérolipides. Les glycolipides sont indiqués en rouge, les phospholipides en bleu et les précurseurs hydrophobes de ces lipides sont encadrés. DPG, diphosphatidylglycérol (ou cardiolipide) ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; PS, phosphatidylsérine ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; (S) groupement sulfate ; (P), groupement phosphate.

c) Synthèse de triacylglycérol

Le DAG est aussi une source pour la production de triacylglycérol (TAG), forme de réserve des lipides (c'est en particulier la forme de stockage lipidique au sein des adipocytes) du fait de son hydrophobicité (permettant un stockage sans eau) et de son caractère fortement réduit. Le TAG n'est pas détecté dans les globules rouges non infectés, mais est l'acylglycérol majoritairement retrouvé chez le parasite *Plasmodium falciparum*. La réaction de synthèse de TAG par transfert d'un acyl sur l'hydroxyl libre du DAG est catalysée par une acyl-CoA:DAG acyltransférase (DGAT) (Nawabi *et al.*, 2003). Cette enzyme a été identifiée *in silico* (accession PFC0995c) et est probablement localisée dans le réticulum endoplasmique (Vielemeyer *et al.*, 2004). Elle apparaît proche de la famille des DGAT1 des eucaryotes. On observe chez les stades sanguins de *Plasmodium falciparum* une accumulation particulièrement importante de DAG et de TAG (surtout au stade schizonte). Ils sont souvent retrouvés sous forme de corps d'inclusions lipidiques constitués d'un noyau hydrophobe de lipides neutres (esters de stérol, DAG, TAG) délimités par des monocouches de lipides amphipatiques tels que phospholipides, glycolipides et/ou stérols (Coppens and Vielemeyer, 2005). TAG et DAG sont

contenus dans des corps d'inclusions lipidiques intimement apposés à la membrane de la vacuole digestive (Jackson *et al.*, 2004). Ces lipides pourraient jouer un rôle dans la détoxification de l'hème (Jackson *et al.*, 2004). Ces corps d'inclusion pourraient aussi représenter des organites de stockage des intermédiaires lipidiques générés lors de la digestion des phosphoglycérolipides dans la vacuole.

d) Synthèse des phosphoglycérolipides

Les phosphoglycérolipides¹⁰ sont des glycérolipides dont le groupement polaire contient un groupement phosphate. Cette tête phosphorylée peut elle-même être engagée dans une liaison ester avec différents alcools (sérine, choline, éthanamine, etc.). 85% des phosphoglycérolipides de membranes de *Plasmodium falciparum* sont constitués de PC et PE. La synthèse de phospholipides est critique pour la prolifération intraérythrocytaire de *P. falciparum*, ce qui en fait une cible de choix dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. L'import de phosphoglycérolipides préformés à partir de lipoprotéines plasmatiques n'apparaît pas significatif *in situ* et l'essentiel paraît être synthétisé par le parasite.

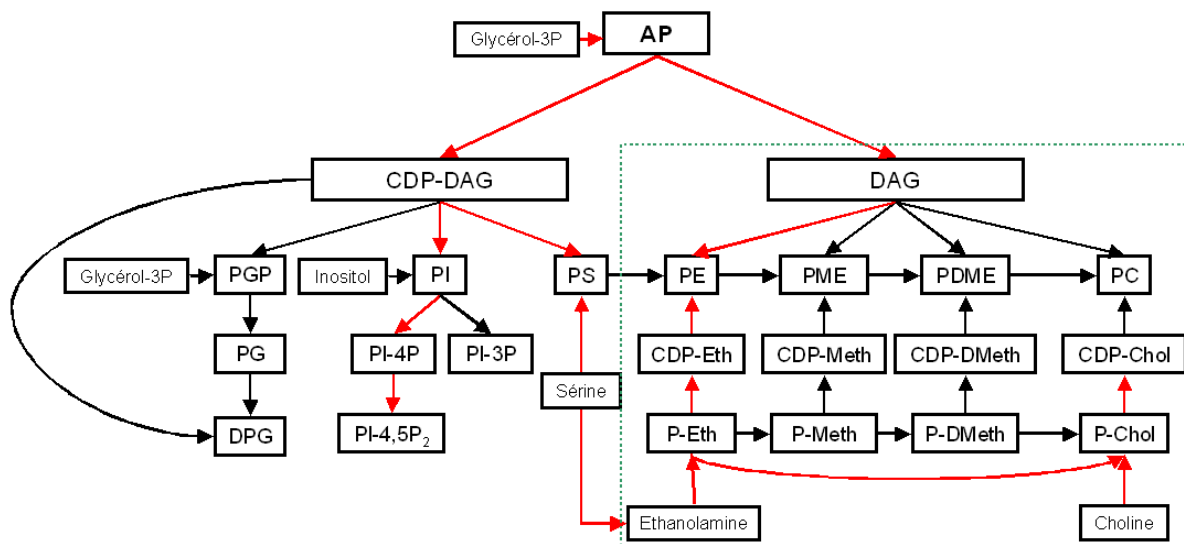


Figure 16 : Voies de biosynthèse des phosphoglycérolipides. Les voies de synthèse dont les enzymes ont été identifiées *in silico* chez *Plasmodium falciparum* sont représentées en rouge. Les voies de biosynthèse des phospholipides à partir du diacylglycérol, appelées voies de Kennedy, sont encadrées de pointillés vert. AP, Acide phosphatidique ; CDP-DAG, Cytidine diphosphate-diacylglycérol ; DAG, Diacylglycérol ; PGP, Phosphatidylglycérol phosphate ; PI, Phosphatidylinositol ; PS, Phosphatidylcholine ; PE, Phosphatidyléthanolamine ; PME, Phosphatidylméthyléthanolamine ; PDME, Phosphatidyl diméthyléthanolamine ; PC, Phosphatidylcholine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI-4P, Phosphatidylinositol-4,phosphate ; PI-3P, Phosphatidylinositol-3,phosphate ; CDP-Eth ; CDP-Meth, Cytidine diphosphate-méthyléthanolamine ; CDP-Dmeth, Cytidine diphosphate-diméthyléthanolamine ; CDP-Chol, Cytidine diphosphate-choline ; DPG, Diphosphatidylglycérol ; PI-4,5P₂, Phosphatidylinositol-4,5biphosphate ; P-Eth, Phosphoéthanolamine ; P-Meth, Phosphométhyléthanolamine ; P-Dmeth, Phosphodiméthyléthanolamine ; P-Chol, Phosphocholine.

¹⁰ Le terme « phospholipide », souvent employé pour désigner les lipides phosphatés, est un terme ambigu puisqu'il qualifie les glycérolipides et les sphingolipides phosphatés.

Une partie des précurseurs de ces lipides sont obtenus soit par transport à partir de la cellule hôte, de façon critique pour la tête polaire (choline, éthanolamine) mais aussi pour une part importante des acides gras (Mitamura *et al.*, 2000). Une partie mineure mais sans doute essentielle des acides gras est synthétisée *de novo* par le système FASII présent dans l'apicoplaste.

Les voies de synthèse *de novo* sont DAG dépendantes et aussi appelées voies de Kennedy (Kennedy *et al.*, 1956). Ce sont des voies qui synthétisent la PC et la PE à partir de choline et d'éthanolamine *via* des intermédiaires CDP-choline et CDP-éthanolamine (Figure 16).

La voie de la CDP-choline : La phosphorylation initiale de la choline en phosphocholine, dans la voie de synthèse *de novo* de la PC est catalysée par une choline kinase (*PfCK*, accession PF14_0020) chez *Plasmodium*. Cette phosphocholine peut aussi être obtenue par les voies transversales, notamment par transméthylation de la phosphoéthanolamine, réaction catalysée par une phosphoéthanolamine N-méthyltransférase (*PfPEMT*, accession MAL13P1.214). La CTP:phosphocholine cytidylyl transférase (*PfCCT*, accession PF13_0092) catalyse quant à elle la synthèse de CDP-choline à partir de phosphocholine. L'étape finale de synthèse de la PC est assurée par une choline phosphotransférase (*PfCPT*, accession PFF1375c), qui appartiendrait aux deux voies CDP-dépendantes. Une activité de conversion de phosphatidylcholine en phosphatidyléthanolamine par l'intermédiaire de lysophospholipides a par ailleurs été mesurée (Grellier *et al.*, 1991).

La voie de la CDP-éthanolamine : La synthèse *de novo* de PE est réalisée par l'action séquentielle de plusieurs enzymes. Chez *Plasmodium*, l'éthanolamine libre est phosphorylée en phosphoéthanolamine par une éthanolamine kinase (*PfEK*, accession PF11_0257). Un groupement cytidyl est alors transféré à la phosphoéthanolamine sous l'action d'une CTP:phosphoéthanolamine cytidylyl transférase (*PfECT*, accession PF13_0253), formant la CDP-éthanolamine. L'étape finale de synthèse de la PE est assurée par une éthanolamine phosphotransférase (*PfEPT*, accession PFF1375c), qui appartiendrait aux deux voies CDP-dépendantes. L'éthanolamine peut aussi provenir de la sérine après décarboxylation et ainsi entrer dans la voie de la CDP-éthanolamine.

La voie de synthèse *de novo* de la PS à partir de CDP-DAG est assurée par une PS synthase. Une PS synthase putative de type I, mitochondriale, a été identifiée chez *Plasmodium falciparum* (*PfPSS*, accession MAL13P1.355). La PS est présente en quantités très faibles chez *Plasmodium*. Ceci paraît être dû à la rapide conversion de la PS en PE par décarboxylation. Cette décarboxylation est assurée par une phosphatidylsérine décarboxylase (*PfPSD*, accession PF11370c) non mitochondriale de type I (Baunaure *et al.*, 2004).

e) Synthèse des glyco glycérolipides

(1) Les glycosylphosphatidylinositols

Depuis les premières identifications de glycolipides par marquages métaboliques chez *Plasmodium*, des identifications plus fines des espèces des glycolipides synthétisés ont été réalisées (Sherwood *et al.*, 1986). Parmi ceux-ci, les glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont les composés glycolipidiques majoritaires des protozoaires parasites. Ce sont des lipides qui ancrent des sucres ou des protéines dans les membranes.

Les GPI ont été identifiés chez le parasite par marquage métabolique utilisant des précurseurs tritiés (Gerold *et al.*, 1994; Gerold *et al.*, 1996). La synthèse des glycosylphosphatidylinositols a lieu dans le RE et consiste en l'acylation d'inositol et le transfert de sucres ainsi que de groupements éthanamine phosphate au noyau glycané (von Itzstein *et al.*, 2008). La voie de biosynthèse des GPI (Gerold *et al.*, 1999), notamment l'action séquentielle des enzymes qui en catalysent les différentes étapes (Delorenzi *et al.*, 2002), a été caractérisée.

Les GPI sont toxiques pour l'organisme de l'hôte (Schofield and Hackett, 1993) mais cette toxicité peut-être régulée négativement par certains acides gras (Debierre-Grockiego *et al.*, 2006). Au total, environ 30 protéines à ancrage GPI ont été identifiées à ce jour chez *Plasmodium* (Gilson *et al.*, 2006).

(2) Les galactolipides chloroplastiques

Comme nous l'avons vu précédemment (Introduction Partie V; Données Bibliographiques Partie I A 2 b), un plaste non photosynthétique acquis par endosymbiose secondaire existe chez le parasite Apicomplexe *Plasmodium falciparum*. Il s'agit d'un organite semi-autonome au même titre que la mitochondrie.

L'origine endosymbiotique secondaire de l'apicoplaste tend à supposer que les deux membranes les plus internes sont raisonnablement des analogues des membranes de l'enveloppe du chloroplaste. Par conséquent des composants structuraux et des activités métaboliques présents au niveau des membranes des plastes végétaux sont susceptibles d'être présents au niveau des deux membranes les plus internes de l'apicoplaste.

Pour leur part, les plastes de plantes sont riches en galactolipides. À la différence des systèmes membranaires eucaryotes qui sont en général riches en phospholipides, les lipides membranaires des plastes des cellules végétales se composent à environ 70% de galactoglycérolipides, *i.e.* le 1,2-diacyl-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-*sn*-glycérol (monogalactosyldiacylglycérol ou MGDG) et le 1,2-diacyl-3-O-(α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl)-*sn*-glycérol (digalactosyldiacylglycérol ou DGDG) (Figure 17).

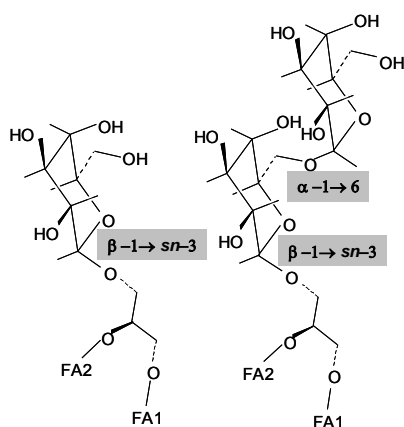
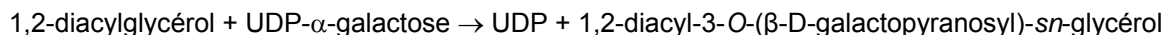


Figure 17 : Structures de MGDG et DGDG. Le ou les galactoses sont liés par une liaison O-osidique avec la fonction alcool primaire en position *sn*-3 du glycérol. FA, groupement acyl.

Le MGDG est synthétisé dans l'enveloppe des chloroplastes de plantes selon la réaction suivante :



Cette réaction de transfert d'un groupe galactosyl du donneur UDP-galactose vers l'accepteur DAG est catalysée par une UDP-galactose:1,2-diacylglycérol 3- β -D-galactosyltransférase ou MGDG synthase. Les MGDG synthases de plantes sont des protéines membranaires, insérées dans un héli-feuillet (protéines monotopiques), et sont actives sous forme de dimères (Marechal *et al.*, 1995). La structure tridimensionnelle d'un monomère de MGDG synthase sous forme d'un double repliement Rossmann (N-terminal et C-terminal) a été modélisée (Botte *et al.*, 2005) par analogie avec une glycosyltransférase d'*E. coli*, MURG, qui a été cristallisée et dont la structure est connue.

La biosynthèse de ces galactolipides est mesurée exclusivement dans les deux membranes limitant les plastes chez les plantes et les algues, l'enveloppe. Outre leur importance pour la biogenèse des membranes plastidiales, les galactolipides sont aussi utilisés dans d'autres compartiments cellulaires, notamment lorsque les plantes viennent à manquer de phosphate, élément nécessaire à la production de phospholipides. Ainsi, en carence de phosphate, on observe une augmentation de la synthèse de galactolipides et un transfert de DGDG des chloroplastes (lieu de synthèse) vers la membrane plasmique, la membrane limitant la vacuole et les mitochondries en lieu et place des phospholipides manquants [pour revue (Jouhet *et al.*, 2007)].

Un marquage métabolique basé sur l'incorporation d'UDP-[^3H]Galactose chez les parasites *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii* a révélé après séparation l'existence de lipides présentant des propriétés chromatographiques similaires de celles des galactolipides chloroplastiques MGDG et DGDG (Marechal *et al.*, 2002). Une activité de synthèse de galactolipides est donc probable dans des extraits parasitaires. La question de l'identité des galactolipides synthétisés avec des galactolipides chloroplastiques, ainsi que leur localisation et voies de synthèse se pose naturellement, d'autant qu'à ce jour, aucune séquence codant pour une MGDG synthase n'a pu être identifiée au sein du génome des Apicomplexes *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* par les outils bioinformatiques actuellement disponibles.

3. Synthèse des sphingolipides

Les sphingolipides sont des lipides proches par leur structure des glycérolipides, dans lesquels la présence de céramide (sphingosine + acide gras) est analogue du bloc glycérol + acides gras. Ils dérivent d'une longue chaîne carbonée (sphingoïde) du type de la sphingosine (chaîne aliphatique possédant plusieurs groupements hydroxyles libres, voir Tableau 8). Les céramides sont constituées d'une chaîne sphingoïde liée *via* une liaison amine, à une chaîne d'acide gras (Tableau 8). Les sphingolipides complexes sont synthétisés à partir des céramides sur lesquelles est greffée une tête polaire.

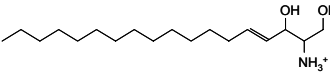
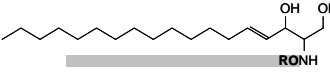
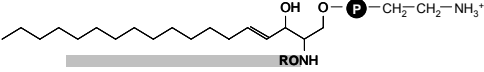
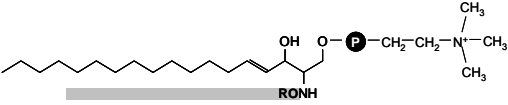
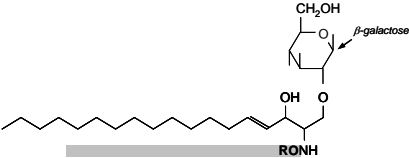
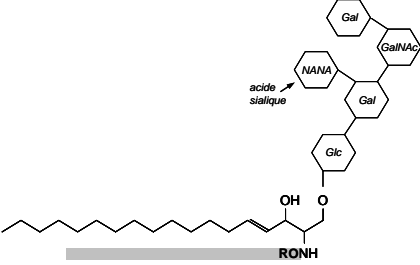
Structure schématique	Classe de lipide
	Sphingosine
	Céramide = sphingosine + amide-acyl (R)
	phosphoéthanolamine céramide
	Phosphocholine céramide (Sphingomyéline)
	Monogalactosylcérobroside (MGCB)
	Ganglioside GM1

Tableau 8 : Différentes classes de sphingolipides. La sphingosine est la plus abondante des sphingolipides qui sont constitués d'une simple chaîne aliphatique portant un groupement amine et des groupements hydroxyles. Les céramides sont les précurseurs de synthèse de l'ensemble des sphingolipides complexes. Elles sont constituées d'une sphingosine qui est liée à une chaîne d'acide gras via une liaison amine. La phosphoéthanolamine céramide et la sphingomyéline représentent deux sphingolipides complexes types. Le monogalactosylcérobroside est un cérobroside ou monohexosylcérobroside. Cette classe de sphingolipide complexe est constituée d'un céramide lié par une liaison O-glycosidique à un hexose. Le GM1 est un ganglioside de la classe des oligoglycocérobrosides.

Longtemps postulée absente chez *Plasmodium* (Ansorge *et al.*, 1995), il semble qu'il existe une synthèse *de novo* de sphingolipides chez le parasite (Gerold and Schwarz, 2001; Landoni *et al.*, 2007).

Connus pour leur présence dans les radeaux lipidiques (Haldar *et al.*, 2002), les sphingolipides sont aussi impliqués dans de nombreux processus cellulaires et physiologiques, en tant que précurseurs d'un grand nombre de métabolites, de messagers cellulaires, d'acteurs du système immunitaire, etc.

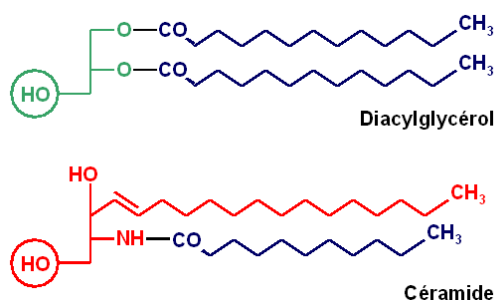


Figure 18 : Analogie structurale entre céramide et glycéride. En vert le glycérol, en rouge la sphingosine, en bleu les acides gras. Le groupement alcool primaire qui peut être estérifié par l'acide phosphorique (phosphoglycérolipides / phosphosphingolipides) ou engagé dans une liaison O-osidique (glycéroglycolipides / sphingosidolipides) est entouré.

- Les phosphosphingolipides

Chez les mammifères, le phosphosphingolipide le plus abondant est la sphingomyéline (SM) (Tableau 9). Au cours de l'infection de l'érythrocyte par *Plasmodium falciparum*, on observe une baisse importante de la quantité relative de sphingomyéline (Tableau 3). Comme la synthèse des phospholipides, la synthèse des sphingolipides est critique pour la prolifération des stades intraérythrocytaires de *P. falciparum*.

Nature de X	Composé
Choline phosphate	Choline sphingomyéline
Ethanolamine phosphate	Ethanolamine sphingomyéline

Tableau 9 : Les classes distinctes de phosphosphingolipides en fonction du radical engagé

Des études avaient suggéré l'absence de voie de synthèse de la SM chez le parasite. Cependant une activité SM synthase a été mise en évidence dans l'appareil de Golgi au cours de la schizogonie intraérythrocytaire chez les mérozoïtes, bien qu'aucune SM synthase n'ait été identifiée *in silico*. La SM synthase, enzyme membranaire est exportée partiellement depuis l'appareil de Golgi vers le RTV au cours des stades anneau et trophozoïte (Elmendorf and Haldar, 1994). Il est vraisemblable que cette synthèse consiste en un assemblage de céramides, produits de l'hydrolyse de SM de l'hôte, et de phosphocholine obtenue à partir de phosphatidylcholine de l'hôte. L'érythrocyte infecté semble arborer deux isoformes de SM synthases, comme le montre le profil d'inhibition de l'activité SM synthase par des analogues de sphingolipides. La synthèse de choline sphingomyéline par le parasite s'avère notamment essentielle pour la formation du réseau tubulo-vésiculaire, dont la membrane est particulièrement enrichie en sphingomyéline (Lauer *et al.*, 1995; Haldar, 1996). Ces études n'ont pas pu être confirmées par d'autres groupes de recherches.

- Les glycosphingolipides

Chez les glycosphingolipides, la fonction alcool des céramides est engagée dans une liaison osidique et substituée par un ou plusieurs oses simples. Ces composés lipidiques sont généralement synthétisés chez les eucaryotes et agissent comme messagers dans la transduction de signaux

cellulaires. Ces lipides regroupent notamment les cérebrosides et gangliosides (Tableau 8). Le monogalactosylcérebroside (MGCB) est le plus abondant des cérebrosides des cellules animales. Il y est retrouvé dans tous les tissus nerveux où il constitue notamment un élément majeur des oligodendrocytes. Le globoside, un oligosidocéramide, est particulièrement répandu à la surface des globules rouges, où il détermine le caractère antigénique des groupes sanguins.

Chez *Plasmodium*, les capacités de synthèse de novo de glycosphingolipides étaient réputées limitées voire inexistantes (Haldar, 1996; Haldar, 1998). Une voie de synthèse *de novo* de glycosphingolipides non essentielle a été démontrée chez le parasite par marquage métabolique à la sérine et glucosamine radioactive (Gerold and Schwarz, 2001). Une glycosylcéramide synthase a aussi été identifiée chez les stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* par utilisation d'UDP-glucose (et d'UDP-galactose) radioactif et de céramides fluorescents (Couto *et al.*, 2004).

L'acide sialique est absent chez le parasite (Schauer *et al.*, 1984), ce qui exclue la présence d'une synthèse de gangliosides. Cependant, la synthèse de sulfoglycosphingolipides chez *Plasmodium* a pu être démontrée (Landoni *et al.*, 2007).

Glycérolipides et sphingolipides sont ainsi deux grandes classes d'acyl-lipides présentant des parentés structurales évidentes (Figure 18), en particulier la présence d'une queue hydrophobe à une/deux chaînes de carbones, et une tête polaire hydrophile. La présence de têtes polaires identiques (phosphocholine pour la PC et la SM, phosphoéthanolamine pour la PE et la phosphoéthanolamine céramide, galactose pour le MGDG et le MGCB) illustre l'existence de voies de synthèse proches ainsi que de phénomènes de transferts de têtes polaires.

B. Trafic des lipides chez *Plasmodium falciparum*

Les acteurs des échanges et du trafic lipidique chez *Plasmodium* sont encore peu connus. Une limite importante à l'étude du trafic lipidique vient du fait que le fractionnement subcellulaire du parasite est particulièrement difficile et que la composition précise des compartiments membranaires de *Plasmodium falciparum* n'a pas encore été finement établie à l'échelle subcellulaire. Au niveau fonctionnel, le suivi de la dynamique lipidique peut être réalisé grâce à des lipides fluorescents (Mikkelsen *et al.*, 1988). Les mouvements de lipides peuvent se produire :

- au sein des membranes par diffusion latérale à l'intérieur d'un feuillet membranaire et / ou échange d'un feuillet à l'autre par mouvements de flip-flop ;
- au sein de la cellule par trafic à l'intérieur de vésicules membranaires, ou en dehors de transferts vésiculaires après prise en charge par des protéines de transport ;

1. Trafic des acyl-lipides

Bien qu'il ne soit pas envisageable à ce jour de donner de vision synthétique de ces événements de trafic lipidique chez *P. falciparum*, certains processus élémentaires ont été caractérisés pour les acyl-lipides.

En tout premier lieu, la captation de lipides du globule rouge par *Plasmodium* est connue depuis longtemps, et est un phénomène important et rapide (Moll *et al.*, 1988). En particulier de rapides mouvements de phospholipides ont lieu de la membrane de la cellule hôte vers le parasite

(Vial *et al.*, 1990). On observe particulièrement un important transfert de PC (plus important chez les globules rouges infectés que les globules rouges non infectés). Le trafic depuis la membrane du globule rouge vers la membrane du parasite implique une mobilité à travers la bicouche, *i.e.* un mouvement de flip-flop de PC médié par une protéine ATP-dépendante à travers la bicouche des membranes d'érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (Haldar *et al.*, 1989). Un trafic des acides gras importés du sérum a par ailleurs été observé pour les classes d'acides gras majoritaires (Beaumelle and Vial, 1986) retrouvées dans le parasite et semble indispensable à la croissance du parasite. Dans des conditions de culture *in vitro*, l'association d'acides gras saturés et insaturés, particulièrement d'acide palmitique (C16 :0) et d'acide oléique (C18 :1), constitue la combinaison la plus favorable à la croissance de *Plasmodium falciparum* (Mitamura *et al.*, 2000). Un trafic unidirectionnel de lipides depuis les lipoprotéines vers le parasite par un mécanisme indépendant de l'endocytose a été de plus rapporté (Grellier *et al.*, 1991). Ce trafic lipidique est particulièrement augmenté au cours du développement du parasite lors du passage du stade trophozoïte à schizonte. En second lieu, de nombreux phénomènes de trafic de lipides ou de précurseurs lipidiques ont été caractérisés à l'intérieur de la cellule parasitaire, en particulier un transport de composés C3, C5, C6 dans l'apicoplaste (Mullin *et al.*, 2006), un trafic de lipides neutres impliquant le réticulum endoplasmique (Coppens and Vielemeyer, 2005), un trafic de lipides vers et depuis la vacuole digestive (Jackson *et al.*, 2004), un trafic des phospholipides entre mitochondrie et réticulum endoplasmique (trafic de la PS du réticulum endoplasmique vers la membrane externe mitochondriale où elle est transformée en PE sous l'action d'une phosphatidylsérine décarboxylase ancrée au niveau de la membrane interne mitochondriale), et un trafic de composants lipidiques des rafts (sphingolipides et de cholestérol) depuis la membrane de la cellule hôte vers la membrane de la vacuole parasitophore (Haldar *et al.*, 2002).

En parallèle des études fonctionnelles résumées brièvement ici, des études bioinformatiques du génome peuvent permettre d'identifier des protéines candidates pour jouer un rôle dans la dynamique des lipides chez *P. falciparum*. Ainsi, soutenant la supposition de l'existence de flippases et de protéines de transport de lipides spécifiques (Haldar *et al.*, 1989), des translocases/flippases à aminophospholipides appartenant au groupe des ATPases de type P (Tang *et al.*, 1996) parmi lesquelles quatre sont référencées dans la base PlasmoDB (PFC0840w, PF14_0654, PFL0950c, PFL1125w) ou des transporteurs ABC possiblement impliqués dans les transports de lipides ont été identifiés. Les données qui les concernent sont encore trop fragmentaires pour les positionner dans un des processus élémentaires listés ci-dessus, et *a fortiori* dans un schéma d'ensemble.

2. Trafic des lipides, trafic des protéines et biogenèse des compartiments membranaires chez *Plasmodium falciparum*

Le trafic de lipides au sein des cellules eucaryotes est indissociable de la dynamique membranaire qui caractérise ces cellules. Tout d'abord, le trafic lipidique peut « suivre le courant », diffusant spontanément dans les feuillettes membranaires, se distribuant suivant l'équilibre énergétique le plus stable, et emporté passivement par les vésicules membranaires. Il peut aussi s'établir à contre courant, par une distribution des lipides suivant des processus énergétiquement coûteux. Enfin le

trafic lipidique peut emprunter des voies indépendantes de la dynamique membranaire, grâce à des protéines de transports entre membranes éloignées ou au niveau de zones de contact.

A la différence des déplacements lipidiques au sein de la cellule, la dynamique des membranes au niveau de leurs composants protéiques a pu être suivie et permet de proposer une vision d'ensemble. Notre meilleure connaissance des mouvements de protéines par rapport aux mouvements de lipides tient au fait qu'il est plus simple de déterminer la dynamique subcellulaire des protéines par le suivi de polypeptides fusionnés à des protéines fluorescentes, ou par imagerie après marquage à l'aide d'anticorps, en compléments d'analyses de biochimie et de génétique. La [Figure 19](#) propose une représentation synthétique des trafics de protéines, en relation avec la dynamique des membranes, dans la cellule plasmodiale.

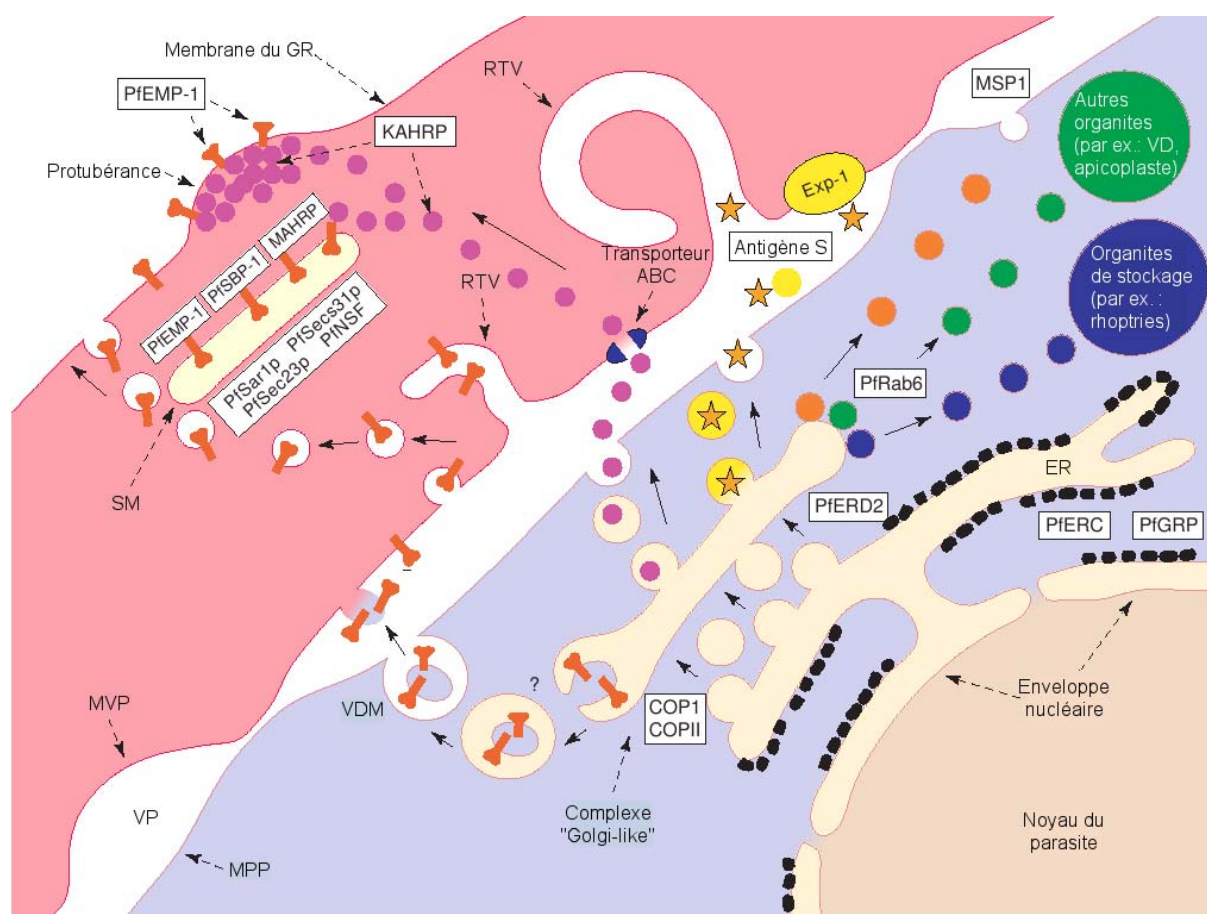


Figure 19 : Trafic des protéines entre les différents compartiments cellulaires de *Plasmodium falciparum* et l'érythrocyte infecté. Les protéines solubles parasites destinées à l'export sont dirigées vers le réticulum endoplasmique par la voie classique de reconnaissance d'une séquence signal N-terminale hydrophobe (appelée peptide signal). ER, réticulum endoplasmique ; VDM, vésicules à double membrane ; MPP, membrane plasmique parasitaire ; VP, vacuole parasitophore ; MVP, membrane de la vacuole parasitophore ; VD, vacuole digestive ; RTV, réseau tubulo-vésiculaire ; SM, structure de Maurer ([Cooke et al., 2004](#)). Les protéines de *P. f.* caractérisées sont encadrées.

Comme pour l'ensemble des eucaryotes, il existe deux grandes voies de trafic pour les protéines de *Plasmodium* codées par le génome nucléaire et adressées vers les organites limités par des membranes ([Kats et al., 2008](#)). La première est la voie de sécrétion classiquement retrouvée chez les eucaryotes supérieurs. La présence d'une séquence signal hydrophobe ([Haldar et al., 2002](#)), avec

un site de clivage de von Heinje, dirige leur passage de manière co-traductionnelle vers le réticulum endoplasmique. Elles sont de là transportées vers l'appareil de Golgi puis délivrées par fusion vésiculaire aux organites cibles (Kats *et al.*, 2006). Le trafic de telles protéines peut être bloqué par traitement à la Brefeldine A (qui inhibe les trafics entre réticulum endoplasmique et appareil de Golgi).

La seconde voie concerne des protéines codées par le génome nucléaire et exportées dans les différents organites et compartiments du parasite. Ces protéines sont ensuite insérées de manière post-traductionnelle par l'intermédiaire de protéines chaperonnes et de complexes appelés translocons, capables de les transporter à travers les membranes.

L'apicoplaste représente un cas particulier associant ces deux voies. L'origine de l'apicoplaste suivant une endosymbiose multiple est confirmée par le mécanisme d'adressage des protéines codées par le génome nucléaire. La dissection de leurs séquences a révélé la présence d'un peptide signal et d'un peptide d'adressage (peptide de transit) impliqués dans un processus bipartite (Figure 20) d'import dans l'apicoplaste (Foth *et al.*, 2003).

Ce processus se décompose en une entrée classique, co-traductionnelle dans le système endomembranaire, médiée par le peptide signal hydrophobe qui est immédiatement clivé, puis d'une entrée dans le stroma de l'apicoplaste, médiée par le peptide de transit riche en asparagine et lysine (Figure 21). L'intégrité du système bipartite est essentielle à l'adressage correct des protéines à destinée apicoplastique codées par le génome nucléaire du parasite (Waller *et al.*, 2000).

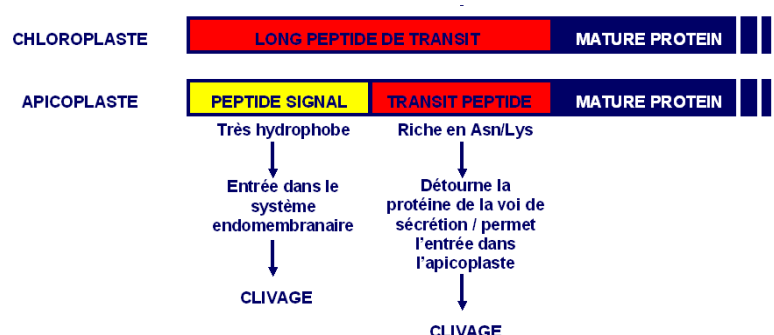


Figure 20 : Comparaison des mécanismes d'adressage de protéines codées par le génome nucléaire à destinée apicoplastique et chloroplastique. Le système d'adressage chloroplastique comporte un peptide de transit N-terminal, clivé lors de l'entrée de la protéine dans le plaste. Le système d'adressage apicoplastique comporte à la fois un peptide signal, clivé lors de l'entrée de la protéine dans le système endomembranaire et un peptide de transit ressemblant aux peptides d'adressage chloroplastiques.

La membrane la plus externe est partie intégrante du système endomembranaire. Les protéines sont donc vraisemblablement transférées *via* des vésicules issues du RE qui vont fusionner avec la membrane externe de l'apicoplaste permettant l'entrée dans l'espace intermembranaire le plus externe de l'apicoplaste. Le peptide d'adressage est ensuite probablement reconnu par un premier puis un second système Toc (aux niveaux de la seconde et de la troisième membrane apicoplastique) puis un système Tic (au niveau de la quatrième membrane apicoplastique). Ces systèmes de translocation permettent aux protéines de franchir les membranes apicoplastiques et d'accéder à la lumière apicoplastique (van Dooren *et al.*, 2000).

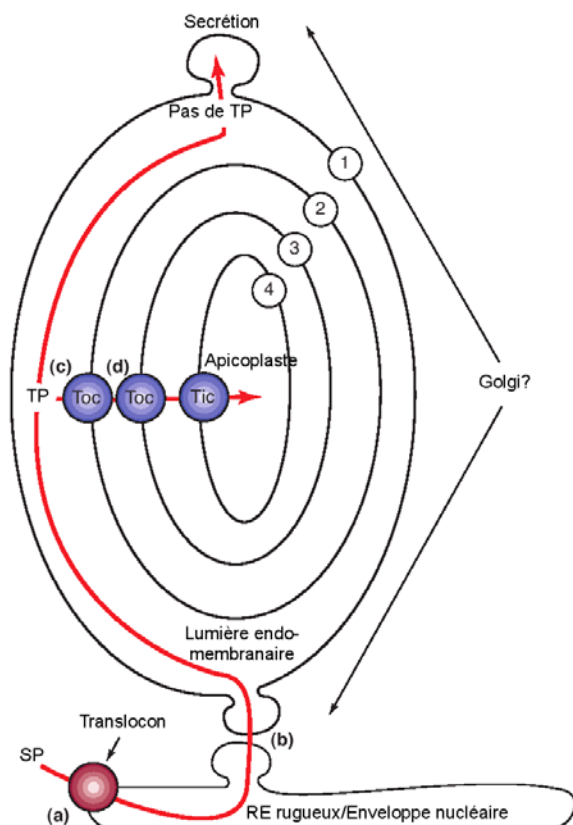


Figure 21 : Système d'adressage bipartite des protéines apicoplastiques. Le peptide signal (SP) permet l'entrée de la protéine dans le système endomembranaire, en continuité avec la membrane la plus externe de l'apicoplaste. Des complexes de translocation Tic/Toc successifs permettraient d'importer les protéines à travers les trois membranes internes (ne relevant pas du système endomembranaire) vers la lumière apicoplastique (van Dooren *et al.*, 2000).

L'articulation du métabolisme et des processus de transports lipidiques avec les événements de trafics protéiques et la dynamique membranaire très intense qui caractérise le parasite au cours de son cycle biologique est loin d'être comprise, et nécessite encore de nombreuses études analytiques et fonctionnelles. Toutefois, du fait de l'importance vitale des lipides membranaires pour la biogenèse d'organites spécifiques ou même pour l'intégrité cellulaire générale, le métabolisme et le trafic lipidique représente une source importante de cibles candidates

C. Métabolisme et dynamique des lipides comme cible de traitements antipaludiques

Le [Tableau 10](#) résume les principales molécules dont l'effet anti-parasitaire est lié à une invalidation de processus clefs du métabolisme et de la dynamique des acyl-lipides membranaires.

Cible	Voie métabolique	Type de traitement et nom du composé	Référence
Synthèse des acides gras			
ACCase (Acétyl-CoA Carboxylase)	FASII	Herbicide : Aryloxyphenoxypropionate	
FabI (Enoy-ACP réductase)	FAS II	Herbicide : Triclosan	(Surolia and Surolia, 2001)
FabH (β -cétolacyl-ACP synthase)	FAS II	Antibiotique : Thiolactomycine	(Waller <i>et al.</i> , 1998)
FabH (β -cétolacyl-ACP synthase)	FAS II	Antibiotique : Cérulénine	(Surolia and Surolia, 2001)
IspC (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductase)	Synthèse des isoprénoides	Herbicide : Fosmidomycine	(Jomaa <i>et al.</i> , 1999)
Phosphoglycérolipides			
Transporteur de choline ?	Synthèse de la PC	Analogue de la choline : TE3, prodrogues de sels de bithiazolium	(Vial <i>et al.</i> , 2004)
	Synthèse de la PC	Analogue de la choline : T3, sels de bithiazolium	(Vial <i>et al.</i> , 2004)
	Synthèse de la PC	Analogue de la choline : G25, sels d'ammonium quaternaire	(Ancelin <i>et al.</i> , 1998) (Vial <i>et al.</i> , 2004)
Phosphoéthanolamine Méthyltransférase (PMT)	Synthèse de PC	Analogue de phosphocholine : Miltefosine (hexadecylphosphocholine)	(Pessi <i>et al.</i> , 2004)
Choline Kinase	Synthèse de PC	hexadecyltriméthylammonium bromide	(Choubey <i>et al.</i> , 2007)
Sphingolipides			
?	Synthèse <i>de novo</i> de céramides	Myriocine	(Gerold and Schwarz, 2001)
?	Synthèse <i>de novo</i> de céramides	Fumonisine B1	(Gerold and Schwarz, 2001)
?	Synthèse <i>de novo</i> de céramides	Cyclosérine	(Gerold and Schwarz, 2001)

Tableau 10 : Molécules anti-plasmodiales ciblant des voies de biosynthèse lipidiques

Les travaux de thèse présentés dans ce mémoire reposent sur l'hypothèse d'une analogie possible entre les synthèses de galactolipides dans les cellules végétales, localisées au niveau des membranes limitant les plastes, et les synthèses de lipides dans les cellules de parasites Apicomplexes, impliquant l'apicoplaste. Suivant cette hypothèse, et dans l'état des connaissances, à savoir l'absence de données relatives à la composition fine des compartiments membranaires subcellulaires du parasite, j'ai d'une part tenté de détecter la présence de lipides proches des galactolipides chloroplastiques dans les cellules de *Plasmodium* au cours du cycle érythrocytaire ([Résultats Chapitre 1](#)). D'autre part j'ai contribué à un développement de molécules anti-parasitaires, visant à optimiser leur effet sur l'agent de la malaria, à partir de composés invalidant la synthèse de galactolipides chez les plantes ([Résultats Chapitre 2](#)).

Matériel et Méthodes

I. Matériels biologiques

A. Culture *in vitro* de modèles de parasites Apicomplexes

1. Culture *in vitro* de stades érythrocytaires asexués de *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum est un organisme Apicomplexe cultivable *in vitro*, dont la première méthode de culture a été décrite par Trager et Jensen en 1976 (Trager and Jensen, 1976). Diverses souches de ce parasite ont été cultivées au cours de ce travail. La plupart sont des isolats cliniques ou de terrain qui ont ensuite été adaptés en culture : les souches chloroquino-sensibles 3D7 (accession ATCC : MRA-102) et Nigerian (Richards and Maples, 1979), et les souches chloroquino-résistantes Dd2 (accession ATCC : MRA-150), W2-Indochina (accession ATCC : MRA-157) et FcM29-Cameroon (Basco *et al.*, 1994). La souche 3D7-attB (accession ATCC : MRA-845), quant à elle, est issue d'une modification génétique de la souche 3D7 par introduction d'un site de recombinaison *attB* (de *Mycobacterium smegmatis*) au sein du gène non essentiel *cg6* (Nkrumah *et al.*, 2006). La souche 3D7 est la souche de référence, choisie pour le séquençage de *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002). L'ensemble des données de séquençage et d'annotation est explorable sur le site de la banque de données génomiques de *Plasmodium* : PlasmoDB (<http://PlasmoDB.org>).

Les stades asexués intraérythrocytaires de *P. falciparum* sont entretenus en cultures continues à 37°C sur tapis de globules rouges humains (de groupe O+, collectés par l'Etablissement Français du Sang, EFS de Montpellier). Les souches 3D7, 3D7-attB, Dd2, W2, FCM29 sont cultivés à 5% d'hématocrite en milieu de culture RPMI 1640 contenant de la L-Glutamine, 25 mM d'HEPES à pH 7,4 (Gibco), et supplémenté avec 0,5% (w/v) de sérum bovin enrichi en lipides (Albumax de type I, Gibco) et 0,0015% (w/v) d'hypoxanthine (Sigma Aldrich) ou milieu complet. La souche Nigerian est cultivée à 7% d'hématocrite en milieu de culture RPMI 1640 contenant de la L-Glutamine, 25 mM d'HEPES à pH 7,4, supplémenté avec 10% de sérum humain (AB+, collecté par l'EFS de Montpellier) et 0,04 mg/mL de gentamycine (Gibco).

Les parasites sont incubés en jarres à bougie ou en chambre d'incubation modulaire (Billups Rothenberg) maintenues sous atmosphère spéciale (mélange gazeux cristal 5% CO₂, 5% O₂ et 90% N₂, Air Liquide) à 37°C. Des changements de milieu et vérifications de parasitémie quotidiens par frottis colorés à la préparation de Romanowski (Diff Quick, Motion Diagnostics), à l'origine de la coloration May Grünwald-Giemsa, ainsi que des dilutions bihebdomadaires des cultures assurent le bon développement des parasites (la durée d'un cycle intraérythrocytaire est d'environ 48 h).

2. Préparation de cultures enrichies en gamétocytes de *Plasmodium falciparum*

La plupart des souches de *P. falciparum* cultivées *in vitro* produisent naturellement des gamétocytes. Ces gamétocytes présents en culture peuvent être enrichis sous certaines conditions de stress. Une méthode simple consiste à cultiver des parasites en fournissant suffisamment de milieu de culture sans passage par ajout de globules rouges frais (Carter *et al.*, 1993). Une culture asynchrone d'érythrocytes initialement parasitée à environ 4% par *P. falciparum* (souche 3D7) est diluée dans du

sang frais afin d'obtenir une parasitémie de 0,5 à 0,7% et un hémocrite de 6% pour un volume total de 15 mL. Un soin méticuleux est pris dans le changement de milieu. Au bout de 4 à 5 jours, une forte parasitémie est atteinte et on observe des changements morphologiques liés au stress des parasites (notamment l'apparition de stades anneaux de forme triangulaire). Dès lors, l'hémocrite est réduit à 3,6% en complétant le milieu de culture à 25 mL.

Quotidiennement et jusqu'à l'obtention de gamétocytes de stade IV-V, le milieu de culture est remplacé par 25 mL de milieu frais (en général il faut 14 à 17 jours après l'établissement de la culture).

3. Culture in vitro de *Babesia divergens*

Babesia est un parasite Apicomplexe à mode de vie assez proche de *Plasmodium*, responsable de la piroplasmose, zoonose pouvant se transmettre à l'homme splénectomisé. La sémiologie est proche de celle du paludisme par la récurrence des fièvres. Parasite de l'Humain, il peut être cultivé dans des conditions semblables à *P. falciparum*. Des érythrocytes infectés par *B. divergens* (souche Rouen 1987, Clone 4) sont cultivés à 5% d'hémocrite dans du milieu RPMI 1640 contenant de la L-Glutamine, 25 mM d'HEPES à pH 7,4, supplémenté par 10% de sérum humain à 37°C en atmosphère contrôlée à 5% CO₂, 19% O₂ (Gorenflot *et al.*, 1991). La durée du cycle de *B. divergens* est plus courte (8 h) que celle de *P. falciparum*. Ce cycle asexué se réduit à une ou deux fissions binaires au sein des globules rouges. Il est alors possible d'observer en culture des érythrocytes parasités contenant un (forme anneau), deux (forme géminée), ou quatre parasites (tétrades) issus des fissions successives qui aboutissent à la libération de mérozoïtes lors de l'éclatement du globule rouge. Les parasitémies obtenues en culture peuvent atteindre 30%.

4. Culture in vitro de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii est un parasite Apicomplexe capable d'infecter virtuellement tous les animaux homéothermes. Chez l'Humain, il provoque la toxoplasmose, qui est probablement la parasitose humaine la plus répandue dans le monde. Parasite intracellulaire obligatoire, *T. gondii* se multiplie au sein d'une vacuole parasitophore qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire développée lors de la phase aiguë de l'infection. Cette phase est suivie par l'enkystement du parasite dans les organes où la pression du système immunitaire est la plus faible. Cette interconversion est caractéristique de la forme chronique de l'infection qui perdure pendant toute la vie de l'individu. Le toxoplasme a un cycle complexe qui implique la transmission entre hôtes par des stades spécialisés pour l'invasion : (i) le stade tachyzoïte, forme proliférative infectieuse chez l'hôte intermédiaire, se développe dans des vacuoles transitoires qui peuvent contenir jusqu'à 128 parasites ; (ii) le stade bradyzoïte, chez l'hôte intermédiaire, est contenu dans des kystes intracellulaires qui mesurent environ 100µm de diamètre et contiennent plusieurs milliers de parasites ; (iii) le stade mérozoïte, chez l'hôte définitif, est le seul stade capable de reproduction sexuée ; (iv) le stade sporozoïte, résultat de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif, libéré dans l'environnement avec les fecès du chat, dans des oocystes. Pour les travaux présentés ici, des tachyzoïtes de la souche RH, délétés du gène codant l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (Donald *et al.*, 1996) ont été entretenus en

culture *in vitro* par dilutions régulières sur des fibroblastes humains de souche HFF (Human Foreskin Fibroblast, accession ATCC : SCRC-1041) en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) complémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Gibco) et 2 mM de glutamine en présence d'antibiotique (100 µg/mL streptomycine, 100 U/mL pénicilline, Gibco).

B. Culture *in vitro* de lignées cellulaires humaines

Des suspensions d'érythroblastes humains de souche K-562 (ATCC CCL-243), de lymphoblastes de souche Jurkat (ATCC: TIB-152), de monocytes de souche THP-1 (ATCC : TIB-202) ou U-937 (ATCC: CRL-1593.2) sont maintenues en culture en milieu RPMI complet (RPMI 1640 complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, 100 µg/mL streptomycine et 100 U/mL pénicilline). Les cellules sont cultivées en incubateur à CO₂ à une densité comprise entre 10⁵ et 10⁶ cellules par mL.

II. Méthodes d'observations par microscopie à épifluorescence

A. Traitement d'échantillons cellulaires pour une visualisation d'épitopes par immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte consiste en la détection d'un antigène (ici le lipide DGDG ou une molécule de structure proche) par liaison spécifique d'un anticorps primaire lui-même visualisé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Des cultures asynchrones de globules rouges humains parasités par *P. falciparum* ou *B. divergens*, des gamétocytes de *P. falciparum* ou des cellules HFF parasitées par *T. gondii*, sont fixées dans du paraformaldéhyde (EM Sciences) 4% en PBS, pendant une nuit à 4°C, ou pendant 45 min à température ambiante. Après 2 lavages en PBS, les globules rouges infectés sont immobilisés sur des lames de 10 puits à revêtement en téflon (Fisher Bioblock) préalablement traitées à la polylysine (traitement selon les instructions du fabricant, Sigma) par une incubation d'une heure sur un mélangeur vertical à température ambiante et en chambre humide. Les cellules fixées sont alors perméabilisées par du Triton X-100 à 0,1% pendant 5 min. Après 3 lavages en PBS, les sites non-spécifiques de réaction des anticorps sont saturés par incubation dans une solution de blocage (5% de sérum de veau fœtal, 5% de sérum de chèvre en PBS) pendant 30 min, puis les globules rouges infectés sont incubés avec l'(les)anticorps primaire(s) dilué(s) (Tableau 11) pendant une heure et lavés 3 fois en solution de blocage avant un couplage de 30 min avec l'(les)anticorps secondaire(s) dilué(s) (Tableau 11) suivi de 3 lavages de 5 min au PBS. Les échantillons sont ensuite montés entre lame et lamelle en milieu Immuno-Mount (ThermoShandon) pendant une nuit avant observation.

Anticorps		Référence	Dilution
Primaires	Sérum lapin anti-DGDG1	(Botte <i>et al.</i> , 2008)	1/25 en solution de blocage
	Sérum lapin anti-DGDG2	(Marechal <i>et al.</i> , 2002)	1/25 en solution de blocage
	Sérum rat anti-DGDG	(Botte <i>et al.</i> , 2008)	1/10 en solution de blocage
Secondaires	Anti rat ou anti lapin ou anti-souris Alexa 488	(Molecular Probes)	1/1000 en solution de blocage
	Anti rat ou anti lapin ou anti-souris Alexa 592	(Molecular Probes)	1/1000 en solution de blocage

Tableau 11 : Anticorps utilisés au cours des expériences d'immunofluorescence. La dilution réalisée est indiquée dans le tableau.

La visualisation des structures ayant réagit avec le ou les anticorps primaires est réalisée grâce à l'anticorps secondaire, en illuminant la lame à la longueur d'onde d'excitation correspondante (495 nm pour le fluorochrome Alexa 488, 590 nm pour l'Alexa 592) et en observant à la longueur d'onde d'émission (519 nm pour le fluorochrome Alexa 488, 617 nm pour l'Alexa 592).

B. Traitement d'échantillons cellulaires pour une visualisation de l'ADN par le réactif de Hoechst

L'ADN nucléaire des cellules humaines, parasitaires, et éventuellement l'ADN des organites (mitochondries, apicoplaste), est coloré pendant 10 min par le réactif de Hoechst 33342 (bisbenzimidazole, Sigma), un agent intercalant fluorescent, dilué à 2 nM final en PBS. Après 3 lavages de 5 min au PBS, la lame est montée à l'aide du système Immuno-Mount (ThermoShandon) pendant une nuit. La visualisation de l'ADN est réalisée en illuminant la lame à la longueur d'onde d'excitation du réactif de Hoechst (355 nm) et en observant à la longueur d'onde d'émission correspondante (465 nm).

C. Observation des structures cellulaires après traitements pour immunomarquage, marquage de l'ADN

Après traitements des échantillons de cellules humaines et / ou parasitaires pour un ou plusieurs immunomarquage(s), marquage de l'ADN et/ou marquage des mitochondries les lames sont observées à l'aide d'un microscope Leica DMRA2 (Leica Microsystems) équipé d'un objectif plan apochromatique 100X à immersion d'huile. Les prises de vue sont réalisées par un appareil de type Micromax YHS 1300 6 (Molecular Devices) contrôlé par le logiciel MetaVue (Molecular Devices) et les images traitées à l'aide du logiciel ImageJ (<http://www.rsbi.info.nih.gov/ij/>).

Afin de visualiser plus finement les structures subcellulaires, certaines lames ont par la suite été observées à l'aide d'un microscope DMRA (Leica Microsystems) équipé d'un objectif plan apochromatique 63X à immersion d'eau muni d'un moteur piézoélectrique. Une série d'acquisitions en plan Z (dans la profondeur de l'échantillon monté sur la lame) est réalisée grâce à un appareil de type CoolSNAP CCD Camera (Photometrics) contrôlé par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices) et les images obtenues sont déconvoluées à l'aide du logiciel Huygens (Version 3.0, Scientific Volume imaging). Le résultat, est visualisé à l'aide du logiciel Imaris (Version 5.7, Bitplane).

L'ensemble des observations a été réalisé à la plate-forme MRI (Montpellier Rio Imaging) du CNRS de Montpellier.

III. Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes de biologies moléculaires utilisées pour les diverses constructions nécessaires aux travaux présentés dans ce mémoire reposent sur les techniques conventionnelles de clonage. Nous décrivons ici certaines méthodes spécifiques aux constructions génétiques pour *P. falciparum*.

A. Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés au cours de ce travail sont résumés dans le [Tableau 12](#) :

Nom	Description	But	Résistance antibiotique
pcHD3/4	Vecteur de destination Gateway contenant le gène de mort <i>ccdB</i> entre les sites de recombinaison attL4 et attR1 (van Dooren et al., 2005)	Recombinaisons Gateway	Ampicilline Chloramphénicol Blasticidine
pHsp	Vecteur d'entrée Gateway contenant le promoteur Hsp entre les sites de recombinaison attL4 et attR1 (van Dooren et al., 2005)	Recombinaisons Gateway	Kanamycine
pCRT	Vecteur d'entrée Gateway contenant le promoteur CRT entre les sites de recombinaison attL4 et attR1 (van Dooren et al., 2005)	Recombinaisons Gateway	Kanamycine
pACPI	Vecteur d'entrée Gateway PENTR/D-TOPO contenant la séquence d'adressage apicoplastique de l'ACP entre les sites de recombinaison attL1 et attL2 (van Dooren et al., 2005)	Recombinaisons Gateway Création de nouveaux clones d'entrée	Kanamycine
pGFP	Vecteur d'entrée Gateway contenant la séquence codant la GFP entre les sites de recombinaison attR2 et attL3 (van Dooren et al., 2005)	Recombinaisons Gateway	Kanamycine
pMGD1	Vecteur d'expression pET-y3a contenant la séquence codant soMGD1 à partir de Leu ⁹⁹ (Nishiyama et al., 2003)	Création du clone d'entrée Gateway pACPIMGD1	Ampicilline
pACPIMGD1	Vecteur d'entrée créé par insertion de la séquence soMGD1 à partir de Leu ⁹⁹	Recombinaisons Gateway	Kanamycine
pUDPGaIT	Vecteur d'entrée créé par insertion de la séquence codant le transporteur d'UDP-Galactose PF11_0141	Recombinaisons Gateway	Kanamycine
pCamBSD	Vecteur contenant le marqueur de sélection Blasticidine-S-Deaminase sous contrôle du promoteur Calmoduline (Sidhu et al., 2005)	Création du vecteur pCamBSD ^{UDPGaIT} , qui doit pouvoir, après transfection, interrompre le gène codant le transporteur d'UDP-Galactose par simple recombinaison	Ampicilline

Tableau 12 : Plasmides utilisés au cours de ce travail

B. Extraction d'ADN génomique de *Plasmodium falciparum*

L'ADN génomique de *P. falciparum* est extrait à l'aide du système DNA Blood Mini Kit (Qiagen) suivant les instructions du fournisseur, puis l'ADN obtenu est quantifié au spectrophotomètre à 260 nm et est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

C. Amplification de fragments d'ADN par PCR

Les oligonucléotides utilisés pour les amplifications d'ADN par PCR au cours de ce travail sont résumés dans le [Tableau 13](#).

Oligonucléotide	Séquence	N _{pb}	T _m
MGD1forAcl	5'-TTGGCGCGCCCTTAATTCCGGGGAGAG-3'	27	53
MGD1revAcl	5'-TTGGCGCGCCCAGCAGCACAAGAGTACTGAC-3'	31	56,2
UDPGalforNotI	5'-ATAAGAATGCGGCCGCCCTTCACCATGGTAAAAATACAGAAGAG-3'	46	46,2
UDPGalrevAcl	5'-TTGGCGCGCCCACCCTTTTATTTTACTTTGAACCTTTTGTG-3'	42	53,7
attB4hsp86For	5'-GTTGTCGTCGACGGAAGGG-3'	20	65,1
attB4CRTFor	5'-GTTGTCGTCGACTAGTAGTTGA-3'	22	54,7
attB3GFPR	5'-GGGTCCTGCAGTCTGGATTA-3'	20	60
UDPGalforBamHI	5'-CGGGATCCGCATCAATAGTTTATGTAGTTTAAGTGC-3'	37	54,1
UDPGalrevNotI	5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTATTTCTTCGATAATTAATGAAGC-3'	42	58,4
pCamBSDint	5'-AAGGGAACAAAAGCTGGAGC-3'	20	60,7
UDPGalTamt	5'-ATTAGGAAGAGGAAGTGATAGG-3'	22	53,5
UDPGalTavl	5'-CCTTGTTTCCTTGTGGATGC-3'	20	60,5

Tableau 13 : Tableau des oligonucléotides utilisés en PCR pour amplifier / vérifier les séquences ADN des vecteurs plasmidiques réalisés dans ce travail

Deux systèmes ont été utilisés afin d'amplifier des fragments d'ADN génomique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR): le premier utilise l'enzyme Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes), le second utilise le mélange de Taq Polymérase Advantage 2 Polymerase Mix (BD Biosciences Clontech). Ces deux systèmes ont été employés afin de contourner les difficultés de certaines amplifications liées à la richesse du génome de *P. falciparum* en AT ([voir Introduction](#)).

Pour le premier type de PCR, 200 ng d'ADN génomique matrice (ou 5 ng d'ADN plasmidique) sont dilués dans 50 µL de tampon HF (solution tampon commerciale, optimisée pour réduire les erreurs de la polymérase Phusion, mais susceptible de réduire l'efficacité de la réaction) en présence d'1 µM de chaque amorce oligonucléotidique, de 200 µM de désoxyribonucléotides (mélange équimolaire de dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et 0,5 µL de polymérase. La séquence des amplifications PCR est la suivante : un cycle d'initiation (dénaturation 40 sec à 98°C, hybridation 30 sec à la température de fusion du couple nucléotidique augmentée de 3°C, élongation 1 min par kb amplifié à 65°C), 28 cycles d'amplification (10 sec à 98°C, 30 sec à la température de fusion augmentée de 3°C, 1 min par kb amplifié à 65°C), un cycle final (10 sec à 98°C, 30 sec à la température de fusion augmentée de 3°C, 10 min à 65°C, puis un maintien à 15°C jusqu'à arrêt).

Pour le second type de PCR, 200 ng d'ADN génomique matrice (ou 5 ng d'ADN plasmidique) sont dilués dans 50 µL de tampon BD Advantage 2 SA PCR (optimisé pour l'amplification d'ADN génomique) en présence d'1 µM de chaque amorce oligonucléotidique, de 200 µM de désoxyribonucléotides et de 1µL d'enzymes BD Advantage 2 Polymerase Mix. La séquence des amplifications PCR est la suivante : un cycle d'initiation (dénaturation 2 min 45 sec à 95°C, hybridation 45 sec à la température de fusion du couple nucléotidique diminuée de 3°C, élongation 1 min par kb amplifié à 62°C), 28 cycles d'amplification (45 sec à 95°C, 45 sec à la température de fusion diminuée de 3°C, 1 min par kb amplifié à 62°C), un cycle final (45 sec à 98°C, 45 sec à la température de fusion diminuée de 3°C, 15 min à 62°C, puis un maintien à 15°C jusqu'à arrêt).

D. Expression épisomale de vecteurs Multisite Gateway

La Figure 22 présente le schéma général de la stratégie de recombinaison par le système Gateway. Cette stratégie a été mise en œuvre afin de créer des plasmides qui puissent être maintenus de façon épisomale après transfection dans *P. falciparum*.

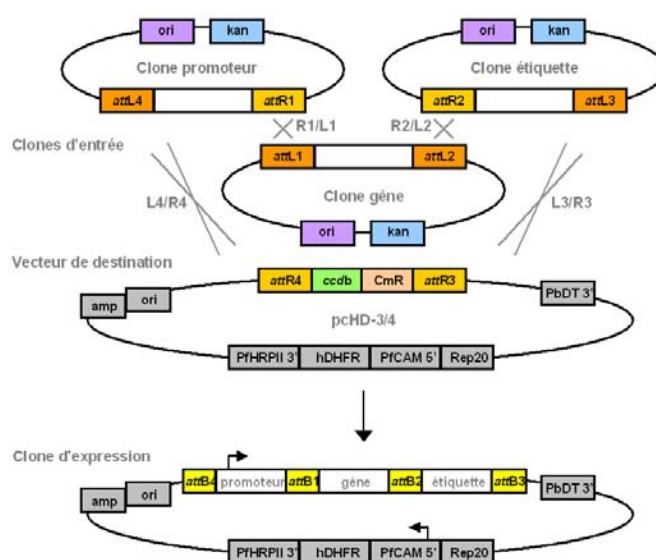


Figure 22 : Schéma de la stratégie de clonage Multisite Gateway adapté d'après [Van Dooren et al., 2005](#). Ce système, adapté pour la transfection de *P. falciparum*, combine l'ensemble classique de clones d'entrées contenant des sites de recombinaison *att* d'un Multisite Gateway à un vecteur de transfection spécifique de *Plasmodium* de type pHBCam modifié (pcHD-3/4). Ce dernier se caractérise par l'ajout de deux cassettes, *ccdB* et *CmR*, flanquées de site de recombinaison *att*, qui permettent respectivement la sélection négative des clones non-recombinants et la sélection positive chez les bactéries résistantes à *ccdB* des clones contenant le vecteur de destination. La mise en présence des clones d'entrées, du clone de destination et d'un mélange de recombinases sous conditions particulières suffit à la production des clones de destinations souhaités.

1. Surexpression épisomale du transporteur d'UDP-galactose de *Plasmodium falciparum*

Un fragment de 1067 pb de la séquence codante du transporteur d'UDP-Galactose (accession PlasmoDB : PF11_0141) a été amplifié par PCR avec les oligonucléotides UDPGalforNotI 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCCCCTTCACCATGGTAAAAATACAGAAGAG-3' et UDPGalrevAscl 5'-TTGGCGCGCCACCCCTTTTATTTTACTTTGAACCTTTTTTG-3' ([Tableau 13](#)) à partir d'ADN génomique extrait de lignée 3D7 de *P. falciparum*.

Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur plasmidique pACPI (Tableau 12) après digestion du fragment amplifié et du vecteur plasmidique pACPI par NotI et AscI (la digestion par NotI et AscI permet d'extraire du vecteur plasmidique la séquence codante du système d'adressage apicoplastique de l'ACP), créant ainsi le vecteur pUDPGalT.

Les vecteurs d'expression pUDPGalT-GFP^{hsp} et pUDPGalT-GFP^{CRT} sont alors créés par réaction LR, en mélangeant chacun des 4 plasmides nécessaires (pCHD3/4, pHsp, pUDPGalT, et pGFP pour pUDPGalT-GFP^{hsp}; pCHD3/4, pCRT, pUDPGalT et pGFP pour pUDPGalT-GFP^{CRT}), et grâce à l'ensemble d'enzymes LR clonase II plus et selon les instructions du fabricant (LR clonase II plus, Invitrogen).

2. Expression épisomale de MGDG synthase exogène

Un fragment de 1295 pb de la séquence codante de soMGD1 (séquence de MGDG synthase 1 d'épinard à partir de Leu⁹⁹, tronquée du peptide de transit chloroplastiques) a été amplifié par PCR avec les oligonucléotides MGD1forAscI 5'-TTGGCGCGCCCTTAATTCCGGGGAGAG-3' et MGD1revAscI 5'-TTGGCGCGCCCAGCAGCACAAGAGTACTGAC-3' (Tableau 13) à partir du plasmide pMGD1 (Tableau 12).

Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur pACPI (Tableau 12) après digestion du fragment amplifié et du vecteur plasmidique pACPI par AscI (la digestion par AscI permet d'insérer la séquence codante de soMGD1 à partir de Leu⁹⁹ en C-ter et dans le cadre de lecture de la séquence codante du système d'adressage apicoplastique de l'ACP).

Les vecteurs d'expression pACPIMGD1-GFP^{hsp} et pACPIMGD1-GFP^{CRT} sont alors créés par réaction LR, en mélangeant chacun des 4 plasmides nécessaires (pCHD3/4, pHsp, pACPIMGD1, et pGFP pour pACPIMGD1-GFP^{hsp}; pCHD3/4, pCRT, pACPIMGD1 et pGFP pour pACPIMGD1-GFP^{CRT}), et grâce à l'ensemble d'enzymes LR clonase II plus et selon les instructions du fabricant (LR clonase II plus, Invitrogen).

E. Génération de Knock Out du transporteur d'UDP-Galactose de *Plasmodium falciparum* par interruption de cadres de lectures de gènes

Un fragment de 528 pb de la séquence codante du transporteur d'UDP-Galactose (accession PlasmoDB : PF11_0141) a été amplifié par PCR avec les oligonucléotides UDPGalforBamHI 5'-CGGGATCCGCATCAAATAGTTTATGTAGTTTAAGTGC-3' et UDPGalrevNotI 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTATTTCTTCGATAATTAATGAAGC-3' (Tableau 13) à partir d'ADN génomique extrait de lignée 3D7 de *P. falciparum*.

Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur plasmidique pCamBSD (Tableau 12) après digestion du fragment amplifié et du vecteur plasmidique pCamBSD par les enzymes de restriction BamHI et NotI, créant ainsi le vecteur pCamBSD^{UDPGalT}.

La Figure 23 présente le schéma de la stratégie de Knock Out par recombinaison simple, permettant d'interrompre le gène codant pour le transporteur d'UDP-Galactose (accession PlasmoDB : PF11_0141). Cette stratégie a été développée par l'équipe de D. Fidock (Sidhu *et al.*, 2005; Sidhu *et al.*, 2006).

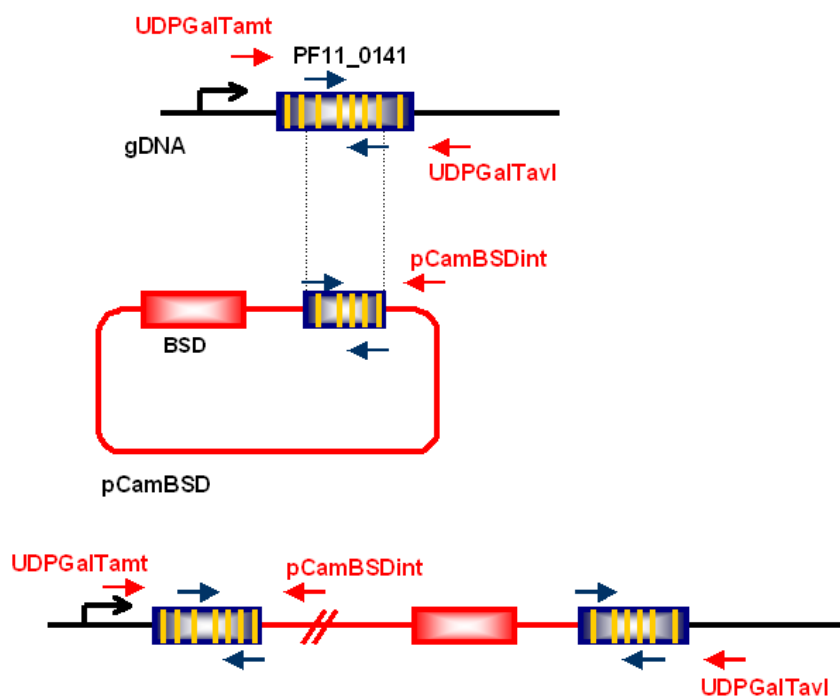


Figure 23 : Stratégie de Knock Out du transporteur d'UDP-Galactose. Le KO est réalisé par recombinaison simple entre un fragment d'ADN amplifié à partir d'ADN génomique et inséré dans le vecteur pCamBSD et la séquence endogène codant pour le transporteur.

F. Transfection chez *Plasmodium falciparum*

La transfection, c'est à dire le transfert d'ADN exogène (ADN codant permettant l'expression, par exemple, de protéines fusionnées à la GFP ou ADN interrompant un gène cible pour réprimer l'expression d'une protéine), est possible chez *P. falciparum* (Fidock *et al.*, 1998; Nkrumah *et al.*, 2006). Les transfections décrites ici sont établies par électroporation de parasites de souche 3D7. De l'ADN plasmidique est préparé par la méthode de Maxiprep selon les recommandations du fournisseur (QIAGEN Plasmid Maxi Kit). L'ADN est élué dans 100 µL de tampon Tris-EDTA (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,1 M, pH 7,6) et est quantifié par spectrométrie. L'équivalent de 100 µg d'ADN (dans un volume maximal de 30 µL) est prélevé, éventuellement précipité à l'isopropanol et dilué dans une solution de milieu cytomix (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 mM Hepes, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, pH 7.6) stérile pour un volume total de 300 µL.

Une culture synchrone de parasites *P. falciparum* (> 5% de forme anneau) est centrifugée 5 min à 1400 rpm à température ambiante, avec décélération douce sans freinage, puis est lavée dans du milieu cytomix en excès. Un aliquot de 100 µL de globules rouges infectés est prélevé et ajouté aux 300 µL de mélange ADN-cytomix. Le tout est transféré dans une cuvette d'électroporation (Bio-rad). L'électroporation est effectuée après paramétrage de l'électroporateur (Bio-rad Gene pulser,

0,31 kV, 950 μ F et maximum de capacitance). Lors du pulse, la constante de temps est de l'ordre de 7 à 11 ms pour une transfection efficace. Après deux rinçages de la cuvette avec 1 mL de milieu complet, le matériel transfecté est transféré dans une boîte de culture contenant 3 mL de milieu complet et 120 μ L de globules rouges. Le tout est incubé 6 h à 37°C sous atmosphère spéciale (mélange gazeux cristal 5% CO₂, 5% O₂ et 90% N₂, Air Liquide) à 37°C. La drogue de sélection (2,5 nM WR99210 ou 2,5 μ g/mL de Blastidine) est ensuite ajoutée au milieu de culture par remplacement du milieu.

Après transfection, un changement de milieu de culture des globules rouges infectés est effectué quotidiennement pendant une semaine, puis tous les deux jours jusqu'à ce que les parasites deviennent visibles sur frottis. Des dilutions hebdomadaires (à 2/5) sont effectuées en globules rouges frais afin d'éviter toute lyse liée à l'âge des cellules.

G. Cycles de sélection

Pour la réalisation des constructions KO du transporteur d'UDP-galactose, trois cycles de sélection successifs sont réalisés afin d'enrichir les cultures en parasites ayant intégré l'ADN plasmidique dans leur génome nucléaire et limiter le nombre de parasites maintenant l'ADN plasmidique, porteur du marqueur de sélection Blastidine-S-déaminase (BSD), sous forme d'épisomes.

Un cycle de sélection correspond à la culture pendant trois semaines des parasites sans drogue de sélection (blastidine) suivie de la culture pendant trois semaines en présence de drogue de sélection.

H. Clonage en plaque 96 puits

L'hématocrite et la parasitémie d'une culture de lignée 3D7 de *P. falciparum* électroporée en présence du plasmide pCamBSD^{UDPGaIT} et ayant été soumise à trois cycles de sélection sont évalués précisément. Pour cela les globules rouges, après dilution de la culture au 1/100 sont comptés en chambre de Neubauer. La parasitémie est, elle, évaluée par comptage sur un étalement mince d'un échantillon de culture (frottis sanguin), après coloration de Romanovsky-Giemsa. La culture est alors diluée en milieu complet contenant la drogue de sélection (Blastidine) de sorte à obtenir 0,5 parasite pour 100 μ L de culture à 2,5% d'hématocrite. 100 μ L de la culture préparée sont déposés par puits dans une plaque de microtitration à 96 puits (P96). 3 jours plus tard 100 μ L de milieu complet avec drogue de sélection et hématocrite de 2,5 % sont rajoutés à chaque puits).

Les parasites sont placés en chambre d'incubation modulaire, maintenues sous atmosphère trigaz (mélange gazeux cristal) à 37°C. Le milieu de culture est remplacé 2 fois par semaine (en alternant milieu complet avec drogue de sélection / milieu complet avec drogue de sélection et hématocrite de 2,5 %). Après 3 semaines, des frottis sont réalisés sur l'ensemble des puits et quelques clones sont maintenus en culture.

I. Vérification de l'expression des protéines par technique d'immuno-marquage (Western Blot)

Après séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (section VI B 2), un électro-transfert sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm (Protran BA 85, Schleicher und Schuell) est réalisé.

Après équilibration du gel dans du tampon de transfert (200 ml méthanol, 14,4 g glycine, 3 g de Tris-Base, complété à l'H₂O jusqu'à 1 L et ajusté au pH 8,3 avec du HCl concentré), le transfert a lieu pendant 1,5 h à ampérage constant (0,8 mA/cm²) au moyen d'un appareil type Fast Blot (Biometra) entre deux plaques de graphite selon la méthode de transfert semi-sec.

Après transfert, l'efficacité du transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose est vérifiée par la coloration au tampon rouge de Ponceau (0,2% rouge de Ponceau, 1% (v/v) acide acétique) puis la membrane est brièvement rincée à l'eau distillée et finalement séchée entre deux papiers Whatman 3 MM (Whatman Ltd.).

L'immuno-marquage est réalisé après un bref rinçage dans de l'H₂O déionisée et les sites de liaison non-spécifiques sont bloqués dans une solution de TNT/lait (5% lait écrémé dans du TNT 1X, soit 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl, et 0,05% Tween 20) pendant une heure à température ambiante. La membrane est ensuite incubée 1 h à température ambiante en solution TNT/lait contenant l'anticorps primaire, dirigé contre la protéine d'intérêt ; ici, il s'agit d'un anticorps de lapin dirigé contre la GFP (Green Fluorescent Protein, Molecular Probes) dilué à 1/10000. Après trois lavages (3x10 min) en TNT 1X la membrane est incubée 1 h à température ambiante en solution TNT/lait contenant l'anticorps secondaire anti-lapin dilué au 1/5000 couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase).

Après trois lavages (3x10 min) en solution TNT 1X à température ambiante, la révélation est réalisée par chimioluminescence en utilisant le système de détection ECL (Amersham) selon les instructions du fabricant.

IV. Méthodes de mesures de l'activité de molécules sur différents systèmes biologiques

A. Principe : la CI50, mesure de l'activité d'une molécule sur un système biologique

1. Définition de la bioactivité et de la CI50

Le criblage pharmacologique automatisé permet de tester en parallèle un grand nombre de molécules sur une cible biologique (protéines isolées, extraits, cellules, organismes). Pour chaque molécule de la collection, le test permettant de mesurer un effet sur une cible biologique est mis en œuvre et le signal correspondant est mesuré. C'est sur la base de ce signal qu'un choix est effectué pour retenir des molécules intéressantes (Figure 24).

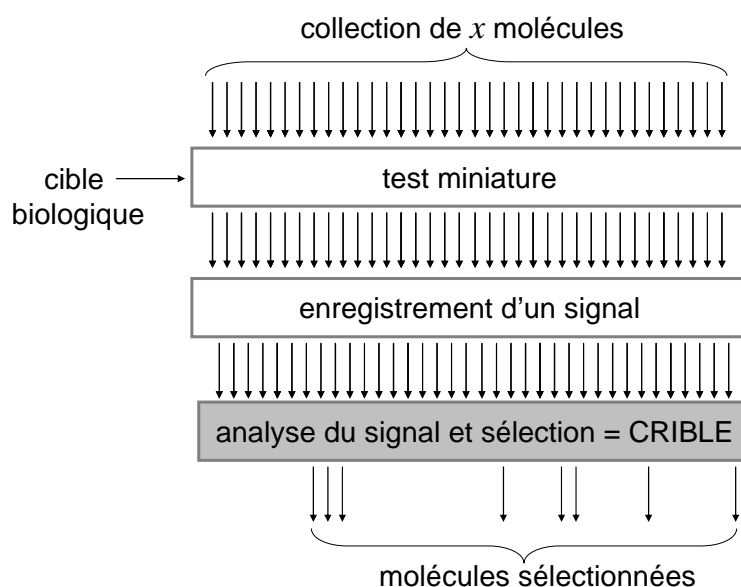


Figure 24 : Schéma d'un processus de criblage pharmacologique

Le criblage est réalisé en plusieurs phases. Avant toute chose, la *cible* est définie, ici la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana* (ou *atMGD1*), exprimée sous forme recombinante chez *Escherichia coli*.

Un *test* est mis au point afin de permettre d'identifier les perturbations intéressantes (ici une *inhibition* d'*atMGD1*) causées par les petites molécules. A l'aide de ce test, le criblage est réalisé. En préalable au travail présenté dans ce mémoire, un criblage de 23360 molécules de la chimiothèque de la société CEREP a été réalisé. Lorsqu'une petite molécule interagit avec une enzyme, un récepteur, une séquence nucléotidique, un lipide, un ion en solution, une structure complexe, etc. elle peut induire une perturbation fonctionnelle intéressante au niveau biologique. On dit alors que la molécule est active sur un phénomène biologique, *i.e.* qu'elle est *bioactive*. La *bioactivité* couvre donc à des degrés divers deux propriétés de la molécule :

- la liaison structurale (liaison sur une protéine, en particulier la MGDG synthase) ;
- l'interférence fonctionnelle (en particulier l'inhibition de l'activité de synthèse de MGDG, mais la molécule peut aussi interférer avec d'autres processus dynamiques intégrés, avec un phénotype cellulaire, etc.).

La *bioactivité* (bioactivity en anglais) est le terme proposé par (Sinkula *et al.*, 1969) pour qualifier l'activité d'une petite molécule sur un système biologique.

La performance d'une molécule bioactive peut être caractérisée quantitativement de plusieurs manières:

- Pour une molécule interférant avec une enzyme, dans des conditions idéales dites Michaeliennes, le **K_i**, ou « constante d'inhibition », permet de qualifier l'efficacité d'un inhibiteur. Pragmatiquement, le calcul du K_i requiert de grandes quantités de matériel et il ne peut être mis en œuvre de façon systématique et parallèle.
- Dans le cas où un inhibiteur est un compétiteur d'un ligand se fixant sur un récepteur, la **CI₅₀**, ou « concentration d'inhibition à 50% de l'inhibition totale », permet de qualifier l'efficacité de la compétition.
- Par analogie, toute courbe effet-dose à partir de laquelle il est possible de mesurer une « concentration de molécule pour laquelle 50% de bioactivité est observée », permet donc de mesurer une grandeur appelée **CI₅₀**, utilisée pour comparer l'efficacité de différentes molécules. Il est important de noter que la CI₅₀ dépend des conditions dans lesquelles sont réalisées le test. Pour un test enzymatique par exemple, il est possible de mesurer une CI₅₀ pour un inhibiteur de l'activité enzymatique étudiée, sans que les conditions Michaeliennes idéales soient remplies (grand excès de substrat et concentration de l'enzyme négligeable). La CI₅₀ dans ce cas n'est pas nécessairement proche du K_i (voir ci-dessous).

2. Différentes CI₅₀ mesurées dans cette étude

Dans l'étude présentée dans ce mémoire, nous avons comparé plusieurs centaines de composés dérivés d'inhibiteurs de la MGDG synthase d'*Arabidopsis thaliana*, sur différents systèmes biologiques. Une CI₅₀ a été déduite pour chacun des tests permettant de mesurer un effet dose, c'est-à-dire :

- une CI₅₀ pour l'effet inhibiteur de l'activité de synthèse de MGDG de fractions purifiées d'enveloppe de chloroplastes d'épinard (il s'agit essentiellement de l'activité de soMGD1) ;
- une CI₅₀ pour l'effet herbicide sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées sur milieu gélosé contenant des doses croissantes d'inhibiteurs (ce test lourd à mettre en œuvre, n'a été réalisé qu'avec les molécules ayant démontré un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique *in vitro*) ;
- une CI₅₀ pour l'effet algicide sur une culture de *Chlamydomonas reinhardtii* en milieu liquide contenant des doses croissantes d'inhibiteurs (ce test n'a été réalisé qu'avec les molécules ayant démontré un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique *in vitro*) ;
- une CI₅₀ pour l'effet inhibiteur de la prolifération de *P. falciparum* dans des globules rouges humains ;
- une CI₅₀ pour l'effet inhibiteur de la prolifération de *T. gondii* dans des fibroblastes humains ;

Chacune de ces CI₅₀ permet de quantifier une propriété intéressante recherchée pour les dérivés. Le processus d'optimisation des molécules visent alors à baisser la et/ou les CI₅₀ mesurées. Dans ce programme d'optimisation, les tests effectués sur enzyme purifiée (atMGD1 et soMGD1), sur fraction d'enveloppe d'épinard (mesurant essentiellement soMGD1) et sur plante (*Arabidopsis*) et algue (*Chlamydomonas*) ont été réalisés au laboratoire PCV par Amélie Zoppé et Julia Revol. Les

tests effectués sur modèle *Toxoplasma* ont été réalisés à l'Institut Jean Roget par Cyrille Botté (équipe C. Mercier). J'ai quant à moi réalisé l'ensemble des expérimentations sur modèles *Plasmodium* et *Babesia*.

Une propriété néfaste, à savoir une toxicité pour l'humain, peut être portée par les molécules étudiées. Le criblage a permis de sélectionner des inhibiteurs de l'activité MGDG synthase qu'on sait ne pas exister chez les Mammifères, mais il n'est bien entendu pas exclu que les inhibiteurs aient une spécificité large pour d'autres cibles moléculaires, ou qu'ils aient des effets délétères par un mécanisme totalement différent de celui qui est sous-jacent à l'inhibition de l'activité MGDG synthase. Notre choix de modèle cellulaire s'est orienté sur une lignée d'érythroblaste (érythroblastes K-562, fournis par M. Vidal, UMR5235 Université Montpellier 2) car d'une part cette lignée possède un cycle qui permet d'adapter aisément le test isotopique en plaque de microtitration (test de Desjardins) à ce modèle de cellule en adaptant les durées d'incubation au cycle cellulaire (ici environ 24h) et le précurseur radioactif (ici de la thymidine tritiée). D'autre part l'origine tissulaire de ces cellules (les érythroblastes étant les précurseurs médullaires des réticulocytes) devrait, si une cytotoxicité est observable, pouvoir refléter certains phénomènes de toxicité pour les globules rouges. Le processus d'optimisation des molécules vise alors à augmenter la CI50 mesurée sur ce modèle biologique. J'ai réalisé l'ensemble des mesures de cytotoxicité sur érythroblaste humain.

B. Mesures de l'inhibition de l'activité enzymatique des MGDG synthases de plantes mesurée *in vitro*

Les membranes biologiques sont naturellement pauvres en DAG. Pour s'approcher des conditions Michaeliennes, c'est-à-dire un excès de substrat DAG par rapport à la teneur en enzyme, les membranes sont déstructurées (solubilisées) par addition d'un détergent zwitterionique, le CHAPS, permettant l'apport de DAG exogène au voisinage de l'enzyme. L'activité de galactosylation du DAG est alors initiée par addition d'UDP-galactose radiomarqué.

Les tests présentés dans ce mémoire ont été réalisés sur différentes fractions enrichies en MGDG synthase d'épinard (fraction purifiée d'enveloppe de chloroplaste d'épinard) ou en MGDG synthase d'*Arabidopsis* (fraction de protéines recombinantes exprimées chez *Escherichia coli* et purifiée par chromatographie sur matrice d'Hydroxyapatite agarose, comme décrit par Awai *et al.* ([Awai et al., 2001](#))).

Du DAG (50 µg de dioléoylglycérol pour les tests de routine) en solution chloroformique est introduit dans un tube en verre et est évaporé à sec sous argon. Le milieu réactionnel (150 µL final) est constitué d'une fraction enrichie en enzyme d'épinard ou d'*Arabidopsis*, de 50 mM MOPS-KOH, pH 7,8, 1 mM DTT, 100 mM KH₂PO₄/ K₂HPO₄, 250 mM KCl et 4,5 mM de CHAPS. Des micelles mixtes contenant le détergent, le DAG exogène et des protéines membranaires, dont la MGDG synthase, se forment. Des concentrations variables de molécule (1-100 µM) sont ajoutées en présence de DMSO (10% final). Le mélange est stabilisé pendant 30 min à 30°C. La réaction est démarrée en introduisant de l'UDP-[¹⁴C]-galactose (37 Bq/µmole, 400 µM) et est arrêtée après 10 min par addition de chloroforme/méthanol 1:2, v/v ; les lipides sont ensuite extraits par la méthode de [Bligh](#)

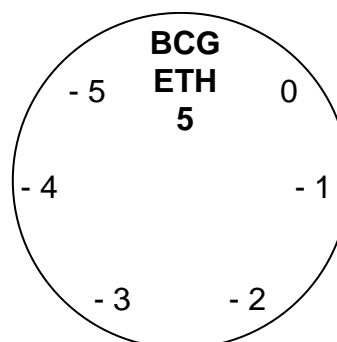
et Dyer (Bligh and Dyer, 1959) et transférés dans un pot de comptage. La mesure de radioactivité est effectuée dans un compteur à scintillation liquide (Betamatic, Kontron).

C. Mesure de l'activité antimycobactérienne *in vitro*

Des mycobactéries (*Mycobacterium bovis*, Bacille de Calmette et Guérin de souche Pasteur 1173P2) sont cultivées en boîtes de Pétri contenant 4 à 5 mL de milieu de culture solide agar-7H11 constitué de 2,1% 7H11 (DIFCO) (w/v), 0,5% glycérol (v/v) dans de l'eau stérile complémenté avec 10% d'OADC (acide oléique, albumine dextrose, catalase) soit en absence (contrôle négatif) ou en présence de composé à tester.

Pour cela, les boîtes sont préparées et les mycobactéries, cultivées en milieu liquide Sauton jusqu'à une DO_{600} d'environ 1 (phase exponentielle de croissance) sont déposées sur les boîtes de cultures aux emplacements prévus. Les dépôts de 5 μ L consistent en des dilutions sériées d'un facteur 10 (Figure 25) de la solution mère (à DO de 1, on a environ 10^5 bactéries / μ L).

Figure 25 : Exemple de préparation de boîte de Petri utilisée pour l'évaluation de la CMI. Une codification est définie pour chaque gamme de dilution d'une drogue potentielle : souche, BCG ; drogue, ETH (éthioamide) ; concentration de la drogue pour dilutions, 5 μ g/ml. Les dilutions suivant une gamme logarithmique sont les suivantes : 0, solution mère de mycobactéries ; -1, solution au 1/10 (10^{-1}) ; -2, solution au 1/100 (10^{-2}) ; -3, solution au 1/1000 (10^{-3}) ; -4, solution au 1/10000 (10^{-4}) ; -5, solution au 1/100000 (10^{-5})



Les boîtes sont incubées deux semaines à 37°C en étuve puis la CMI, qui correspond à la concentration de composé minimal requise pour inhiber 99% de la croissance des mycobactéries est évaluée.

D. Mesures de l'activité antipaludique *in vitro*

1. Détermination de l'activité antipaludique sur des cultures asynchrones, suivant le test de Desjardins

L'activité antipaludique est mesurée *in vitro* sur culture asynchrone de globules rouges infectés par *P. falciparum* selon une méthode modifiée (Ancelin *et al.*, 2003) d'après le microtest isotopique de Desjardins (Desjardins *et al.*, 1979). Les suspensions de globules rouges infectés (1,5% d'hématocrite final, 0,6% de parasitémie) sont cultivées en milieu complet (RPMI 1640 supplémenté avec 0,5% d'Albumax de type I), soit en absence de composé à tester (contrôle), soit en contact avec des concentrations variables établies par dilutions sériées en milieu complet à partir d'une solution concentrée (10 mM en DMSO) du composé à tester. Après 48 h d'incubation, 0,5 μ Ci [3 H]-hypoxanthine (un précurseur nécessaire à la synthèse des acides nucléiques du parasite,

radiomarké, GE Healthcare) sont ajoutés à chaque puits de la plaque de microtitration. Puis après 18 h d'incubation supplémentaires, la réaction d'incorporation d'hypoxanthine est stoppée et les cellules lysées par congélation directe à -80°C . Après décongélation, les macromolécules parasitaires, y compris les acides nucléiques radiomarkés, sont recueillies sur filtre (UniFilter-96 GF/C, Perkin Elmer) au moyen d'un collecteur de cellules (Filtermate, Packard Biosciences). Après 8 lavages consécutifs du filtre, afin d'éliminer l'hypoxanthine radioactive non incorporée, un cocktail de scintillation (Microscint-O, Perkin Elmer) est ajouté au filtre et la radioactivité incorporée est alors mesurée au compteur à scintillation (TopCount NXT, Packard Biosciences).

Le bruit de fond radioactif est mesuré à partir de globules rouges non infectés et soustrait de chaque mesure du filtre. La viabilité des parasites traités est mesurée par leur capacité de synthèse d'acides nucléiques à partir d'un précurseur radiomarké ($[\text{H}^3]$ -hypoxanthine) comparée à celle des parasites contrôles cultivés en absence du composé étudié. Elle est exprimée en pourcentage du contrôle. Les mesures sont analysées au moyen des logiciels Excel (Microsoft) et Prism (Graphpad Software), puis la CI50 (concentration en composé capable d'inhiber *in vitro* 50 % de la croissance des parasites) est déterminée graphiquement. Les résultats obtenus sont exprimés sous forme d'une moyenne de CI50 (la concentration en molécule qui conduit à 50% d'inhibition de croissance du parasite *in vitro*), résultantes d'au moins deux expériences réalisées indépendamment (différentes cultures parasitaires, différentes dilutions) en duplicat.

Afin de détecter un éventuel effet inhibiteur retardé de certaines molécules ciblant notamment des voies de biosynthèse apicoplastiques, le test de Desjardins est adapté de telle sorte que le précurseur radioactif est ajouté avec un délai d'un cycle (Divo *et al.*, 1985; Goodman *et al.*, 2007). Le milieu de culture est donc remplacé 48 h, 72 h et 96 h après le temps t_0 de mise en contact de la culture d'érythrocytes infectés et de la molécule évaluée. Au moment du dernier changement de culture, après 96 h, 0.5 μCi d' $[\text{H}^3]$ -hypoxanthine dans 30 μL de milieu complet sans hypoxanthine sont ajoutés à chaque puits. La réaction d'incorporation est stoppée après 18 h par congélation à -80°C et les plaques sont traitées comme précédemment. La CI50 est alors mesurée.

2. Détermination de l'activité antipaludique en fonction du stade parasitaire

La plage¹¹ de synchronisation d'une culture de parasites *P. falciparum* pré-synchronisée est réduite par une nouvelle synchronisation (temps t_0) par un traitement au sorbitol 5% pendant 5 minutes suivi d'une centrifugation et de lavages en RPMI (qui ne retient que le stade jeune, dit en anneau) peu de temps après l'invasion de globules rouges sains par les mérozoïtes. Les parasites (1% d'hématocrite finale, 0,6% de parasitémie initiaux dans un volume de 1,5 mL) sont alors soit cultivés en absence de composé à tester (contrôle), soit cultivés en contact avec des concentrations variables établies par dilutions sériées en milieu complet à partir d'une solution concentrée (10 mM en

¹¹ La plage de synchronisation qualifie la distribution de parasites qui, dans une population en culture, sont engagés dans des stades de développement proches ou similaires. Lorsqu'un traitement de la culture sélectionne un stade particulier, l'ensemble de la population qui est sélectionné par le traitement est dit synchronisé, avec une plage de synchronisation réduite.

DMSO) du composé à tester. Pour évaluer l'effet des molécules sur chaque stade, le composé est ajouté après 4h pour le stade anneau, 20 h pour le stade trophozoïte ou 32 h pour le stade schizonte, pendant une durée de 4 h. À l'issue des 4 h d'incubation, les puits sont lavés en milieu complet sans hypoxanthine. Les cultures sont alors redistribuées en plaques de microtitration 96 puits (200 µL par puits). Après 52 h, 0.5 µCi d' $[^3\text{H}]$ -hypoxanthine dans 30 µL de milieu complet sans hypoxanthine sont ajoutés à chaque puits. La réaction d'incorporation est stoppée après 75 h par congélation à -80°C et les plaques sont traitées comme précédemment. La CI50 est alors mesurée (Ancelin *et al.*, 2003).

E. Mesure de la cytotoxicité sur cellules humaines *in vitro*

Des suspensions de cellules humaines (8000 cellules par puits) sont cultivées dans du milieu RPMI complet (200 µL) soit en absence du composé à tester (contrôles), soit en contact avec des concentrations variables établies par dilutions sériées en milieu RPMI complet à partir d'une solution hautement concentrée (10 mM en diméthyl sulfoxyde, DMSO) du composé à tester. Après 24 h d'incubation (soit environ un cycle cellulaire), 0.5 µCi de $[^3\text{H}]$ -thymidine (précurseur radiomarké de synthèse des acides nucléiques) dilués dans 30 µL de milieu RPMI complet sont ajoutés à chaque puits de la plaque de microtitration. Après 6 h d'incubation supplémentaire, la réaction d'incorporation de thymidine est stoppée par congélation à -80°C. Comme pour la détermination de l'activité anti-paludique *in vitro*, les macromolécules, incluant les acides nucléiques radiomarkés, sont collectées sur filtre. La radioactivité incorporée est mesurée au compteur à scintillation après addition de cocktail scintillant.

Le bruit de fond radioactif est mesuré à partir de milieu RPMI complet et retranché de chaque mesure du filtre. La viabilité des cellules traitées par le composé à tester est mesurée par leur capacité de synthèse des acides nucléiques à partir du précurseur radiomarké par comparaison avec les cellules contrôles cultivées en absence du composé. Elle est exprimée en pourcentage du contrôle. Les mesures sont analysées au moyen des logiciels Excel et Prism et la CI50 (concentration en composé capable d'inhiber *in vitro* 50 % de la croissance des cellules) est déterminée graphiquement.

Les CI50 ainsi déterminées sont le résultat d'au moins deux expériences réalisées indépendamment (différentes cultures cellulaires, différentes dilutions) en dupliquât.

V. Méthode de fractionnement de protéines sur matrice d'affinité

A. Principe général

Un des analogues étudiés au cours du travail présenté dans ce mémoire a été synthétisé en associant un groupement biotine à un composé initial bioactif (Figure 26). Ce composé biotinylé peut être fixé sur une matrice couplée à une petite protéine, l'avidine (ici la neutravidine), grâce à la très forte affinité de la biotine pour l'avidine. La matrice, couplée tout d'abord à l'avidine et chargée ensuite en molécule biotinylée, permet le fractionnement de protéines par chromatographie suivant les techniques conventionnelles (Bayer and Wilchek, 1990).

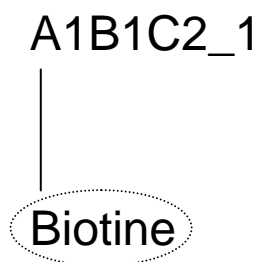


Figure 26 : Schéma de la molécule biotinylée A41B1C2_1. Le groupement biotine est indiqué par un cercle. La structure moléculaire peut être visualisée en accord avec E. Maréchal, laboratoire IRTSV PCV

B. Préparation de la matrice d'affinité

Un volume de 2 mL d'une suspension de matrice couplée à la neutravidine (UltraLink Immobilized Neutravidin Protein Plus, Pierce ; 2 mL de suspension correspondent à 1 mL de matrice stabilisée) est lavé cinq fois par 10 mL de PBS et incubé en présence de 100 µg de molécule biotinylée A41B1C2_1 (Figure 26) diluée à 5% (w/v) dans du DMSO, 2 heures à température ambiante sur roue. La matrice peut par ce traitement lier plus de 30 µg de biotine. Après 5 lavages avec le milieu d'équilibration (milieu ayant servi à l'extraction des protéines, voir ci-dessous), la matrice couplée est prête à être chargée avec l'échantillon protéique.

C. Préparation des échantillons biologiques

Une culture de globules rouges infectés par des stades mixtes de *P. falciparum* de souche 3D7 ou une quantité équivalente de globules rouges non infectés est récoltée et centrifugée à 1500 rpm à température ambiante. Après avoir retiré le surnageant, le volume de culot globulaire est estimé et un frottis est réalisé sur les globules rouges infectés afin d'en mesurer la parasitémie. Le culot est repris dans de la saponine 0,05% diluée en RPMI 1640 afin de lyser les membranes des globules rouges. Le tout est centrifugé à 2300 rpm et le surnageant, contenant une grande quantité d'hémoglobine, est éliminé.

Après 2 lavages en RPMI 1640, le culot résiduel est soumis à une lyse hypotonique par ajout de 20 volumes d'eau (contenant des inhibiteurs de protéases exempts d'EDTA) suivie d'une incubation de 10 min sur de la glace. À partir de cette étape, les échantillons sont maintenus à 4°C. Après ultracentrifugation à 100.000 g pendant 1 h, le surnageant contenant les protéines solubles est recueilli. Le culot correspondant à la fraction membranaire est remis en suspension dans 3,5 mL de tampon d'extraction 1 (10 mM Tris pH 7,4, 0,5% triton X-100) et incubé sous agitation douce par rotation pendant 30 min à température ambiante. Après une nouvelle ultracentrifugation pendant 1 h à 100.000 g, le surnageant contenant les protéines membranaires solubilisées par le Triton X-100 est recueilli. Le culot est remis en suspension dans 3,5 mL de tampon d'extraction 2 (10 mM Tris pH 7,4,

0,5% triton X-100, 1M NDSB-201) comme décrit par Vuillard ([Vuillard et al., 1995](#)), et est ensuite incubé sous agitation douce par rotation pendant 30 min à température ambiante. Après ultracentrifugation, le surnageant contenant les protéines membranaires solubles en Triton X-100 et sulfobétaïne NDSB201 (3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate, Fluka) est collecté.

La concentration de protéines des différents échantillons est dosée par la méthode BCA (Uptima, Interchim).

D. Chargement des échantillons sur la matrice d'affinité

0,01 mg de streptavidine (Pierce) sont préalablement ajoutés aux échantillons afin de saturer les protéines naturellement biotinylées et limiter leur rétention sur les sites neutravidines éventuellement libres de la matrice. Un échantillon de 100 μ L est conservé pour analyse ultérieure. La matrice couplée à la molécule A41B1C2_1 est suspendue avec l'échantillon, préparé en absence ou présence de détergent, pendant 1 h sur roue à température ambiante. L'ensemble est ensuite chargé dans une colonne (1 mL de matrice, hauteur de 2 cm) jusqu'à sédimentation complète. La fraction correspondant aux protéines n'ayant pas lié la matrice couplée est recueillie. Les protéines de cette première fraction sont précipitées en présence d'acide trichloracétique (TCA, Sigma) et sont conservées pour analyse.

La matrice est lavée avec 10 mL de milieu d'équilibration (10 applications de 1 mL de milieu correspondant au milieu d'extraction ayant permis de préparer l'échantillon protéique) puis les protéines couplées aux molécules biotinylées sont éluées en présence de diéthylamine 1 M pH 11,5 dans le milieu d'extraction (4 applications de 1 mL). Les pH de la fraction éluee et de la colonne sont immédiatement équilibrés par du Tris 1 M pH 7,4. Cette fraction protéique est précipitée en présence de TCA. La matrice est récupérée, lavée et préparée à nouveau comme dans la section précédente pour une nouvelle utilisation. Deux matrices différentes ont été utilisées afin de traiter séparément les extraits de globules rouges et les extraits de globules rouges infectés.

VI. Méthode d'analyse des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes

A. Préparation des échantillons de protéines

Les protéines de fractions collectées après chromatographie sur matrice d'affinité sont concentrées par précipitation en présence d'acide trichloracétique (TCA) selon la procédure suivante : 1 volume de solution de TCA ($0,5 \text{ g.mL}^{-1}$ dans de l'acétone) est ajouté à 4 volumes de solution de protéines ; l'ensemble est homogénéisé et incubé 30 min à 4°C puis centrifugé 5 min à 4°C à 13000 rpm ; le culot est lavé 2 fois avec 200 μ L d'acétone. Après élimination du surnageant, le culot protéique obtenu est séché 30 min à température ambiante puis repris avec du tampon de charge de Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,1% de bleu de bromophénol, 5% glycérol dans de l'eau) et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

B. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

1. Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes

Le contenu protéique des diverses fractions protéiques conservées est analysé par séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de séparer les polypeptides en fonction de leur masse moléculaire, après dénaturation par le SDS et la chaleur. Les échantillons protéiques sont dilués avec du tampon de dépôt (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, glycérol 10% [v/v], SDS 1% [v/v], bleu de bromophénol 0,01% [v/v] et DTT 25 mM), et sont portés à ébullition pendant 2,5 minutes pour achever la solubilisation et la dénaturation des protéines. Les échantillons sont alors déposés sur un gel d'acrylamide constitué (1) d'un gel de concentration contenant 5% [v/v] d'acrylamide et (2) d'un gel de séparation contenant 12% [v/v] d'acrylamide. L'électrophorèse est conduite à voltage constant (200 V) dans du tampon de migration de composition suivante : Tris 25 mM, glycine 0,192 M, pH 8,3, SDS 0,1% [v/v]. La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol atteint le bas du gel.

2. Coloration des protéines au bleu de Coomassie

Le gel de polyacrylamide est coloré par incubation de 30 min dans la solution de coloration (acide acétique 10% [v/v], isopropanol 25% [v/v], bleu de Coomassie 2,5 g.L⁻¹ [Coomassie brilliant-blue R250, Sigma]). Le gel est ensuite décoloré plusieurs fois dans un mélange méthanol 40% [v/v], acide acétique 7% [v/v] pour révéler les protéines présentes sur le gel d'acrylamide.

VII. Méthode de microséquençage de protéines par spectrométrie de masse

Le microséquençage de protéines a été réalisé au Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes (EDyP, iRTSV, CEA Grenoble ; dir. J. Garin) sur des protéines de *P. falciparum* et d'érythrocytes humains, fractionnées par chromatographie d'affinité et séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Après migration et coloration du gel, un morceau de gel contenant une (ou plusieurs) protéine(s) d'intérêt est découpé, lavé puis incubé en présence de trypsine comme indiqué par Ferro *et al.* (Ferro *et al.*, 2002). Les peptides tryptiques sont extraits du gel par addition de 10 µL d'acétonitrile 50% [v/v], séchés sous vide, resolubilisés dans 2 à 3 µL d'acide formique 0,1% [v/v], dessalés par une microcolonne de phase inverse en système de chromatographie liquide fonctionnant à nano-débit (CapLC, Waters), et nébulisés par ionisation electrospray (ESI) dans un spectromètre de masse de type Quadrupole-TOF (ESI-Q-TOF ; Ultima, Micromass) (Ferro *et al.*, 2002). La masse des peptides tryptiques permet d'identifier la ou les protéines dont ils peuvent être issus, grâce à la carte peptidique massique (CPM), analogue à une empreinte digitale, des protéines. Les données expérimentales issues du spectromètre de masse sont entrées dans un logiciel de recherche (Mascot, MatrixScience) qui les comparent aux données déduites de chacune des séquences présentes dans la banque de données protéiques interrogée (PlasmoDB ou Trembl pour *P. falciparum*, après digestion *in silico* de ces protéines par la protéase utilisée, pour générer des CPM ou des spectres de fragmentation théoriques). Il en résulte une liste de toutes les protéines pouvant correspondre aux données expérimentales, classées selon leur score de probabilité, dont l'analyse conduit à l'identification de ou des protéine(s) présente(s) dans l'échantillon analysé.

VIII. Méthodes d'analyse des lipides

Afin d'apprécier une activité de synthèse de galactolipides, des parasites sont mis en présence du précurseur radioactif de la réaction de synthèse : de l'UDP-[¹⁴C]Galactose. Cette expérience a été conduite sur diverses lignées parasitaires (lignée 3D7 de *P. falciparum* ainsi que les lignées transgéniques dont la construction a été détaillée au cours de la [partie III D](#)). Elle a aussi été conduite en absence et présence de molécule A1B1C2_1. L'activité de synthèse de lipides radioactifs est évaluée après extraction des lipides totaux, séparation sur chromatographie couche mince et révélation par immunohistochimie.

A. Marquage de lipides à l'UDP-[¹⁴C]galactose

Des cultures de parasites *P. falciparum* de souche 3D7 en globules rouges ainsi qu'une quantité équivalente de globules rouges non infectés sont parallèlement lysées en présence de saponine 0,1% en milieu complet puis centrifugées à 2500 rpm à température ambiante. Les culots de parasites sont ensuite lavés 3 fois dans du milieu RPMI.

Une réaction d'incorporation est réalisée par mise en contact de 20 µL de parasites avec 4 µCi d'UDP-[¹⁴C]Galactose (NEC429050UC, Perkin Elmer) préalablement évaporés sous l'azote puis dissous dans 200 µL RPMI (ou de 200µL de RPMI contenant 75 µM de molécule A1B1C2_1). Les expériences sont réalisées en triplicats.

Après une heure d'incubation en bain-marie à agitation douce à 37°C, 50 µL de solution d'UDP-galactose froid 10 µM en RPMI sont ajoutés aux tubes réactionnels.

Après une heure d'incubation supplémentaire, une lyse hypotonique des parasites est réalisée par ajout de 250 µL de tampon de lyse (dH₂O complétée par 0,5% de CHAPS et des inhibiteurs de protéases).

Après 2 h d'incubation supplémentaires, la réaction d'incorporation est arrêtée par l'extraction des lipides.

B. Extraction des lipides

Les lipides sont extraits selon le protocole de Bligh et Dyer ([Bligh and Dyer, 1959](#)). 1 mL de méthanol puis 500 µL de chloroforme sont ajoutés à l'échantillon aqueux. Le mélange est homogénéisé brièvement (vortex) et laissé reposer une nuit à – 20°C. 500 µL de chloroforme puis de l'eau (qsp 900 µL) sont ensuite ajoutés. Après agitation au vortex, le mélange est centrifugé à 800 rpm pendant 10 min. L'échantillon se présente comme un biphasé, composé d'une phase inférieure organique, contenant l'ensemble des lipides et une phase aqueuse supérieure. La phase organique est récupérée à l'aide d'une pipette de Pasteur, transférée dans un nouveau tube en verre, et évaporée sous azote. Les lipides sont repris dans 200 µL d'un mélange chloroforme / méthanol (2 :1) puis conservés à – 20°C.

C. Séparation des lipides par chromatographie sur couche mince unidimensionnelle

La séparation par chromatographie sur couche mince repose sur l'adsorption différentielle des lipides d'un échantillon entraînés par un courant de phase mobile (ici un mélange de solvants) le

long d'une phase stationnaire constituée par une mince couche de gel de silice doublant une plaque de verre.

Les lipides sont séparés par chromatographie unidimensionnelle sur une plaque de verre doublée d'une couche mince de gel de silice 20 cm x 20 cm de 60 μm d'épaisseur avec zone de préconcentration (Merck) préalablement activée 1 h à 100°C, en comparaison avec des galactolipides standards (disponibles : DGDG, MGDG).

Les échantillons, après évaporation sous azote et dilution dans un volume minimal de 20 μL sont déposés en bordure (Figure 27), et la plaque est transférée dans une cuve préalablement équilibrée dans le système de migration chloroforme-méthanol-eau (65:25:4, volume/volume). La migration est arrêtée lorsque le front de solvant atteint 1 cm du bord opposé au dépôt.

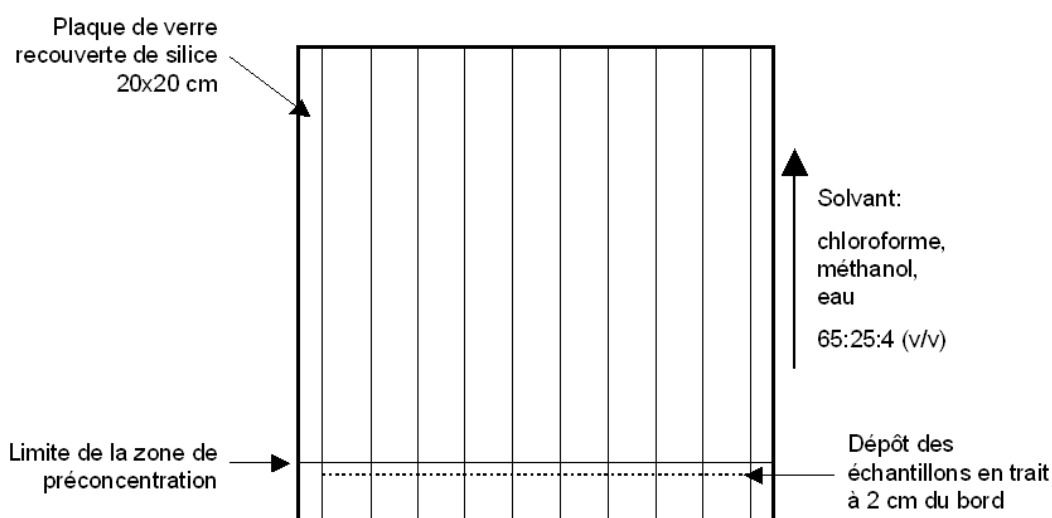


Figure 27 : Analyse de lipides par chromatographie unidimensionnelle sur couche mince de silice.

Les lipides ayant incorporé de la radioactivité à partir du précurseur UDP-[^{14}C]Galactose sont révélés par autoradiographie (Films Kodak Biomax MR/MS, Perkin Elmer). Après des durées variables d'exposition en cassette étanches, éventuellement munies d'un système amplificateur de signal (Kodak Biomax, Perkin Elmer), les films autoradiographiques (Kodak Biomax MS/MR, Perkin Elmer) sont développés.

La révélation des acides gras insaturés contenus dans les lipides séparés en chromatographie couche mince est par ailleurs réalisée dans une cuve par coloration aux vapeurs d'iode.

IX. Méthodes chemoinformatiques de modélisation et de comparaison structurales de petites molécules

Une superposition des structures moléculaires d'un des inhibiteurs étudiés dans ce mémoire, A1B1C2_1, et du diacylglycérol (DAG) a été réalisée, en collaboration avec S. Aci (CMBA, CEA Grenoble). Les structures du DAG et de l'inhibiteur A1B1C2_1 ont été dessinées en 2 dimensions à

l'aide de l'outil MarvinSketch de la suite MarvinBeans de Chemaxon, puis converties en structures 3D à l'aide de la commande 3D>build de l'interface de MarvinView (suite MarvinBeans de ChemaAxon). En utilisant ce même outil, une recherche conformationnelle a été effectuée et les structures de plus basse énergie ont été stockées afin de servir de structure de départ à des calculs de dynamique moléculaire. Les paramètres du champ de force pour les molécules DAG et A1B1C2_1 ont ensuite été calculés à l'aide du programme ANTECHAMBER (<http://ambermd.org/antechamber>) fourni avec la suite de modélisation et dynamique moléculaire AMBER9.0 (Case *et al.*, 2006).

Une dynamique moléculaire en solvant implicite a ensuite été effectuée sur chacune de ces structures :

- Pour le DAG : Le système a été minimisé sur un calcul de 5000 cycles, les 3000 premiers cycles en utilisant l'algorithme de minimisation « steepest descent » (minimisation plus grossière et plus rapide) puis les 2000 cycles suivants en passant sur un algorithme de minimisation du type « conjugate gradient » (minimisation plus fine, donc plus lente). Le solvant implicite a été simulé en utilisant le modèle GB/SA (modèle de Born généralisé, GB, utilisé pour calculer la contribution électrostatique de l'énergie libre de solvation + un terme dépendant de la surface accessible au solvant, SA, rendant compte de la contribution non-polaire de l'énergie libre de solvation). La constante diélectrique du solvant a été ajustée à 4.0 afin de rendre compte d'un environnement protéique (constante diélectrique = 78,5 ou 80,0 lorsque l'environnement considéré correspond à de l'eau).

Le système a été ensuite directement équilibré à une température de 300K (l'étape de chauffage n'est pas nécessaire dans le cas d'une simulation en solvant implicite) sur une période de 10ps, dans un système NTP (nombre d'atomes constant, température et pression constantes).

Une simulation de 10 nanosecondes suivie de 10 nouvelles nsec de simulations (apparition d'une seconde conformation) a ensuite été réalisée sur ce système.

- Pour A1B1C2_1 : Les mêmes étapes minimisation, équilibration, production ont été effectuées sur cette structure ; seulement 10 nsec de simulation ont été réalisées (une seule conformation stable pendant ces 10 ns).

Les analyses de RMSD (Root Mean Square Deviation), permettant de comparer des structures moléculaires tridimensionnelles, ont été effectuées en utilisant le module ptraj de la suite AMBER9.0.

Les superpositions des molécules et leur visualisation ont été réalisées à l'aide des logiciels Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) et VMD (Visual Molecular Dynamics; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)

Recherche de lipides analogues aux lipides chloroplastiques et de protéines homologues aux enzymes impliquées dans leur synthèse et dynamique, chez *Plasmodium falciparum* et d'autres modèles Apicomplexes

Chez les plantes, les principaux galactolipides (notamment le MGDG et le DGDG) sont synthétisés et essentiellement localisés au niveau des membranes plastidiales (voir Rappels Bibliographiques). Dans certaines conditions telles que la carence de phosphate, un remaniement lipidique est induit à l'échelle cellulaire et se traduit par la présence de galactolipides dans des membranes extraplastidiales telles que la membrane mitochondriale (Jouhet *et al.*, 2004), la membrane vacuolaire (Andersson *et al.*, 2005) et la membrane plasmique (Andersson *et al.*, 2003). Dans les cellules dotées de plastes les plus étudiées, à savoir les cellules des Angiospermes, les galactolipides jouent donc un rôle à la fois essentiel pour la biogenèse plastidiale, ainsi que pour la constitution de l'ensemble des membranes cellulaires. Il n'existait, avant la découverte de l'apicoplaste chez les parasites Apicomplexes, aucune cellule dotée de plaste dont l'analyse lipidique n'ait montré une absence de MGDG et de DGDG, des algues unicellulaires aux Angiospermes.

La synthèse de galactolipides de type chloroplastique avait été suggérée chez les Apicomplexes lors de précédents travaux (Maréchal, 1994; Marechal *et al.*, 2002) suite à un marquage radioactif en présence d'[³H]UDP-galactose de lipides aux propriétés électrophorétiques compatibles avec celles des galactolipides après marquage métabolique chez *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*.

A ce jour, aucune séquence codant pour une MGDG synthase n'a pu être identifiée au sein du génome des Apicomplexes *T. gondii* et *P. falciparum* par les outils bioinformatiques actuellement disponibles. Il est à noter cependant qu'aucune séquence homologue des MGDG synthases n'a pu être mise en évidence chez certains autres protistes pour lesquels la synthèse de galactolipides est avérée, par exemple chez les protistes chlorophylliens du phylum des Euglènes (Botte *et al.*, 2005). L'identification formelle de MGDG ou de DGDG n'est toutefois pas encore établie par des analyses structurales conclusives, telles que par résonance magnétique nucléaire ou spectrométrie de masse chez les Apicomplexes : la question de l'existence de lipides de type chloroplastique n'est donc pas résolue.

Dans ce chapitre, nous présentons une recherche de structures moléculaires analogues aux lipides chloroplastiques chez *P. falciparum* et d'autres parasites Apicomplexes apparentés, essentiellement selon des approches de reconnaissances immunologiques par des anticorps spécifiques bien caractérisés. Cette étude complète une analyse similaire réalisée chez *T. gondii* par C. Botté, alors doctorant au laboratoire PCV et à l'institut Jean Roget, Grenoble. Il est important de noter que *P. falciparum* est un parasite de très petite taille (se divisant dans un globule rouge de 7 µm de diamètre) par comparaison avec *T. gondii*, et que de ce fait, la détermination fine des structures subcellulaires éventuellement marquées est très difficile. L'ensemble des analyses sur différents modèles de parasites Apicomplexes a fait l'objet d'une publication (Botte *et al.*, 2008).

Nous présentons aussi une recherche de protéines impliquées dans la synthèse et la dynamique de galactolipides chez *P. falciparum*. Une étude exploratoire d'un transporteur putatif d'UDP-galactose a ainsi été engagée. Enfin, en absence de données fonctionnelles relatives à une enzyme de synthèse de galactolipides identifiée chez les Apicomplexes, l'insertion d'un gène codant pour une MGDG synthase de plante dans le génome du parasite a été initiée pour de futures études fonctionnelles.

I. Caractérisation d'un épitope de structure proche des digalactolipides chez les Apicomplexes de la sous-classe des Haemosporidea

En préalable aux travaux présentés dans ce mémoire, des anticorps polyclonaux dirigés contre du DGDG ont été mis au point au laboratoire : deux d'entre eux, anti-DGDG1 et anti-DGDG2 (Maréchal, 1994), ont été produits par immunisation de lapins avec du DGDG purifié de chloroplastes d'épinards, le troisième (anti-DGDG3) a été produit par immunisation d'un rat avec du DGDG purifié de chloroplastes d'épinards. La spécificité de l'anti-DGDG2 a été testée par immunomarquage de lipides standards et d'extraits lipidiques séparés par chromatographie sur couche mince, déposés individuellement sur une membrane de nitrocellulose (Maréchal, 1994; Botte *et al.*, 2008). L'anti-DGDG2 réagit avec le DGDG purifié, les lipides extraits de l'enveloppe d'épinard et les lipides extraits de *P. falciparum* et *T. gondii*. L'anti-DGDG2 paraît très spécifique du DGDG. Il ne réagit pas avec l'ensemble des lipides standards testés (y compris les galactolipides chloroplastiques MGDG et TriGDG) autres que le DGDG, ni les lipides membranaires extraits de cultures bactériennes d'*Escherichia coli*.

L'ensemble des résultats de marquage métabolique de parasites et d'immunomarquage de lipides déposés sur membranes de nitrocellulose indique la synthèse de lipides structuralement proches des galactolipides chloroplastiques chez les parasites Apicomplexes *P. falciparum* et *T. gondii*. La question de la nature et de la localisation fine de ces lipides est dès lors posée. Afin de tenter de répondre à cette question, l'ensemble des anticorps anti-DGDG a donc été utilisé en marquage par immunofluorescence.

Dans ce chapitre, l'épitope reconnu par les anticorps anti-DGDG est nommé DGLE (pour DiGalactolipid-Like Epitope) (Botte *et al.*, 2008). Les résultats présentés concernent la localisation et la dynamique du DGLE chez deux Apicomplexes Hemosporidae (*Plasmodium*, *Babesia*) complètent une étude semblable chez des Apicomplexes Coccidia (*Toxoplasma*, *Neospora*) (Botte *et al.*, 2008).

A. Etude de la localisation subcellulaire d'un DGLE chez le parasite Apicomplexe *Plasmodium falciparum* au cours de sa phase érythrocytaire

La localisation subcellulaire du DGLE a été analysée par microscopie à épifluorescence (Matériel et Méthodes). La mise au point d'un protocole de microscopie pour *P. falciparum* s'est avérée délicate, en particulier l'établissement des conditions de fixation (et de perméabilisation). En effet, il convient d'éviter au maximum l'utilisation de détergents ou de solvants des lipides, l'épitope des anticorps utilisés étant de nature lipidique. La méthode la plus appropriée développée au cours de ce travail est décrite dans la section Matériel et Méthodes.

Après marquage avec l'anticorps anti-DGDG2 visualisé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, puis marquage en présence de l'intercalant de Hoechst (Figure 28), le signal émis en immunofluorescence indirecte est analysé par comparaison avec les structures cellulaires détectées en contraste de phase. L'ajout d'intercalant de Hoechst permet de visualiser l'ADN nucléaire et contribue à différencier les parasites dans leurs différents stades de développement. Ainsi, au cours de ce travail, les phases du cycle érythrocytaire ont été distinguées de la façon suivante :

- Les stades anneaux, de petite taille et mononucléés, caractérisés par l'absence de pigment h  mozo  ine.
- Les stades trophozoïtes, de tailles variables, mais toujours mononucléés. Ils synthétisent un pigment : l'h  mozo  ine, qui apparaît blanc en contraste de phase.
- Les schizontes, plurinucl   s et occupant l'ensemble du cytoplasme du globule rouge. Lors de leur éclatement, ils libèrent les mérozoïtes.

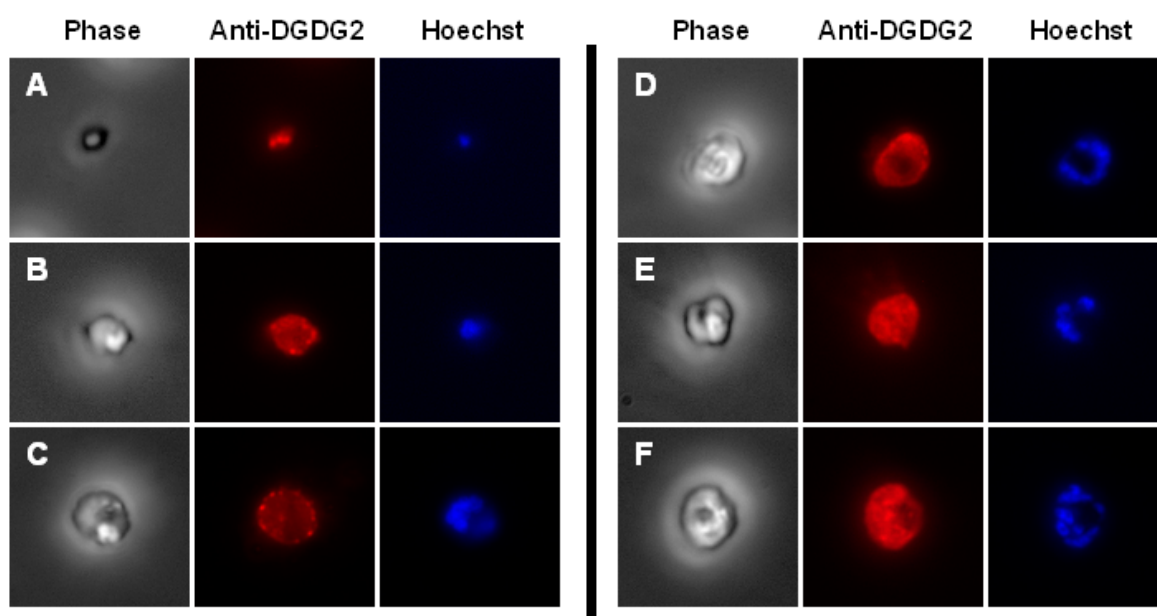


Figure 28 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG détecté par immunomarquage chez les formes érythrocytaires asexuées de *Plasmodium falciparum*. Des cultures asynchrones d'érythrocytes infectés par *P. falciparum* ont été fixées, perméabilisées et incubées en présence d'anti-DGDG2, d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, puis du réactif de Hoechst. **(A) Parasite en stade anneau.** Le DGLE est localisé à une zone marginale du parasite. **(B) Parasite en stade trophozoïte.** Le DGLE est détecté en p  ri  rie du parasite par des signaux ponctuels. **(C-F) Parasite en stade schizonte.** Chez les schizontes plus jeunes (C), comme pour les trophozoïtes, le DGLE semble localisé en p  ri  rie ; chez des schizontes plus âgés, ces signaux ponctuels se retrouvent dans toute la cellule. Un signal moins intense semble marquer la p  ri  rie des futurs mérozoïtes.

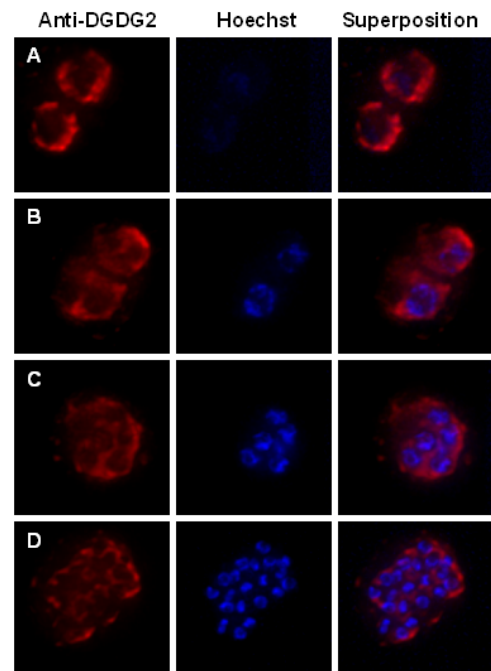
Au cours des 3 stades parasitaires asexués de la phase érythrocytaire, la distribution du DGLE détecté par l'anti-DGDG2   volue. Ainsi, chez le parasite en stade anneau (Figure 28 A), le DGLE est détecté sous forme d'un signal marginal p  ri  rique très localisé et intense. Lors de l'évolution en stade trophozoïte (Figure 28 B), le DGLE se distribue en signaux ponctuels en p  ri  rie du parasite, ce qui semble être aussi le cas de façon plus marquée en stade schizonte

(Figure 28 C). Chez les schizontes tardifs, en plus des signaux ponctuels, le DGLE semble être redistribué dans les membranes des mérozoïtes en formation.

A cette échelle de grossissement, la localisation fine dans des compartiments membranaires est difficilement appréciable. La nature exacte des structures observées doit donc être évaluée au moyen de techniques microscopiques plus performantes en termes de résolution. L'utilisation de marqueurs spécifiques de divers compartiments parasites, en comarquage, ainsi que le passage à des techniques telles que l'analyse de plans déconvolués ou la microscopie électronique sur *P. falciparum* semblent donc constituer une étape indispensable à une localisation plus précise de cet épitope.

Afin d'observer de façon plus fine la localisation du DGLE chez *P. falciparum*, particulièrement au cours du stade schizonte, des séries de prises de vue en plan Z (dans la profondeur de l'échantillon) ont donc été effectuées sur des préparations identiques à celles observées en immunofluorescence indirecte. Les séries ont été déconvoluées comme il est décrit dans la section [Matériel et Méthodes](#).

Figure 29 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG chez les formes asexuées de *P. falciparum* après déconvolution. (A) Parasite au stade trophozoïte. Le DGLE est détecté par un signal ponctuel périphérique identique au signal observé en immunofluorescence classique. (B) Parasites au stade jeune schizonte. Alors que le noyau se divise, le signal ponctuel évolue en plaques périphériques. (C) Parasite au stade schizonte. L'analyse fine du signal montre une redistribution du marquage au niveau des membranes des mérozoïtes. (D) Parasites libérés au cours de l'éclatement du globule rouge. L'épitope est localisé en périphérie des parasites de façon non uniforme autour des mérozoïtes.

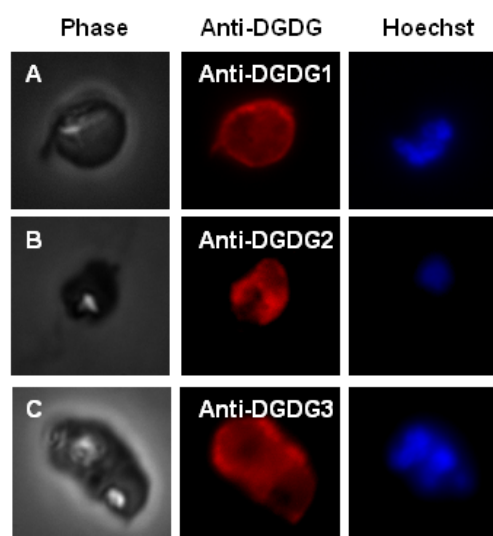


Au cours de la formation des mérozoïtes au sein du schizonte, l'épitope réagissant avec l'anticorps anti-DGDG2 est d'abord localisé de façon ponctuelle autour du parasite (Figure 29 A), puis migre en plaques périphériques chez le jeune schizonte (Figure 29 B), pour se redistribuer en périphérie des mérozoïtes en formation (Figure 29 C et D).

Les résultats des marquages observés en immunofluorescence indirecte montrent des localisations identiques avec les trois anticorps anti-DGDG1, anti-DGDG2 et anti-DGDG3 (Figure 30). Cependant, pour obtenir un signal d'intensité semblable, le titrage de l'anticorps anti-DGDG3 doit être

augmenté par rapport aux autres anticorps (anti-DGDG3 est couramment dilué au 1/10^{ème}, tandis que anti-DGDG1 et anti-DGDG2 sont couramment utilisés au 1/25^{ème}).

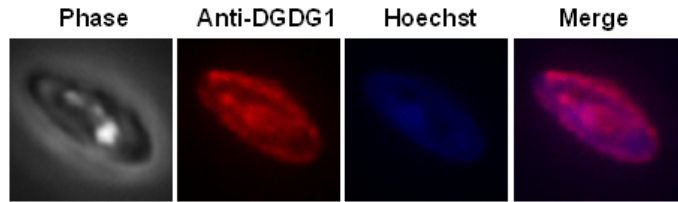
Figure 30 : Marquages de parasites *P. falciparum* par les trois anticorps anti-DGDG à des stades de développement proches. (A) Marquage anti-DGDG1 chez un jeune schizonte. (B) Marquage anti-DGDG2 chez un trophozoïte mature. (C) Marquage anti-DGDG3 chez un jeune schizonte. Dans tous les cas un signal périphérique similaire est observé.



Afin de localiser plus finement le DGLE chez *P. falciparum*, nous avons souhaité passer à l'échelle de l'observation par microscopie électronique. Des expériences de marquage en présence des anticorps anti-DGDG1, anti-DGDG2 et anti-DGDG3 ont été réalisées sur coupes de *P. falciparum* (coupes ultrafines sur échantillons inclus en résine LR white et sur échantillons congelés). Le marquage secondaire a été réalisé avec de la protéine A couplée à des particules d'or. Les coupes ont alors été observées en microscopie électronique. En dépit d'essais répétés et de nombreuses préparations (modifiant les méthodes de fixation, de coupe, d'inclusion et les résines), aucune expérience de marquage en présence des anticorps anti-DGDG1, anti-DGDG2 et anti-DGDG3 n'a permis de déterminer de localisation spécifique chez *P. falciparum* en microscopie électronique. Un marquage cytoplasmique et nucléaire diffus a pu être observé, mais ne correspondait pas à un signal spécifique. Il est à noter que l'épitope qui fait l'objet de ce travail étant vraisemblablement un lipide, de nombreuses biais peuvent expliquer ces difficultés: lors de la fixation (la plupart des fixateurs sont des solvants des lipides), lors de la coupe (l'épitope étant supposé membranaire, il est attendu que l'inclusion de l'échantillon, puis sa coupe réduisent très fortement la biodisponibilité de l'épitope pour un marquage par un anticorps).

La lignée de *P. falciparum* utilisée lors de ces expériences de marquage (lignée 3D7) possède la capacité se différencier en gamétocytes. Ces stades sexués sont plutôt rares en cultures, leur forme est oblongue et leur taille plus importante que celle des autres stades sanguins (2 à 3 fois). Le complexe membranaire interne est particulièrement développé chez les gamétocytes. La Figure 31 montre un gamétocyte observé par immunofluorescence, issu d'une préparation de culture mixte de parasites lors d'un marquage avec l'anticorps anti-DGDG1.

Figure 31 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG chez le gamétocyte de *P. falciparum*. L'épitope se distribue de façon ponctuelle en périphérie du parasite. Un signal peut être observé au niveau de structure(s) intracellulaire(s) qui reste(nt) à définir. La micrographie montre vraisemblablement un gamétocyte mâle en stade IV-V de la gamétocytogénèse.



Chez le gamétocyte, le signal correspondant au DGLE est distribué à la périphérie du parasite sous forme de points, de façon comparable au signal observé chez les formes érythrocytaires asexuées. Un marquage additionnel, intracellulaire indique une localisation de l'épitope au niveau d'un ou plusieurs organites du parasite. Il serait intéressant de déterminer la nature de cet organe.

La mise au point d'un protocole d'enrichissement en gamétocytes des cultures de souche 3D7 ([Matériel et Méthodes](#)) a permis d'affiner la localisation de l'épitope chez ce stade parasitaire lors des différents stades érythrocytaires sexués du parasite avec l'anti-DGDG1 et l'anticorps anti-DGDG2. Les résultats obtenus sont similaires avec l'anti-DGDG1 (non montré) et l'anticorps anti-DGDG2 ([Figure 32](#)).

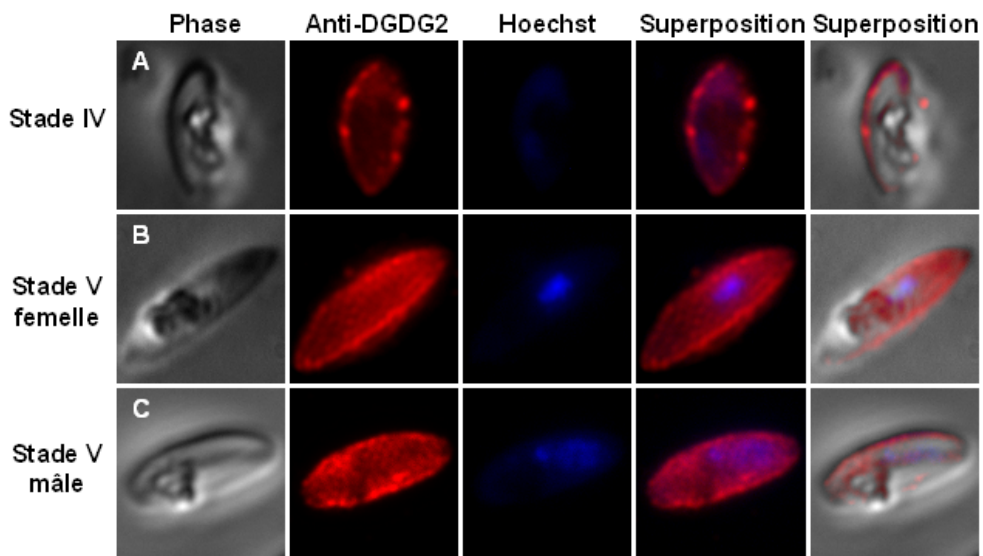


Figure 32 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG chez des gamétocytes à divers stades de développement. (A) Gamétocyte de *P. falciparum* en stade IV. Le marquage à l'anti-DGDG2 apparaît comme périphérique et ponctuel, situé à proximité ou au niveau d'une membrane périphérique. **(B) Gamétocyte femelle de *P. falciparum* en stade V.** **(C) Gamétocyte mâle de *P. falciparum* en stade V.** Chez les gamétocytes en stade V de développement, l'épitope est distribué de façon semblable, en périphérie du parasite ainsi que sous forme d'une ponctuation plus fine et régulière qui semble suivre un trajet éventuellement défini par un ou des éléments du cytosquelette.

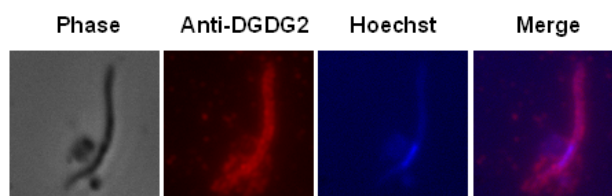
La [Figure 32](#) montre qu'un signal périphérique est observé pour l'ensemble des gamétocytes. Chez les gamétocytes les plus matures, une ponctuation plus fine et régulière est observable, dont la structure globale semble former une réticulation en surface du parasite, probablement définies par un ou des éléments du cytosquelette. Pour certains parasites, comme sur la [Figure 31](#), le DGLE est aussi

détecté à l'intérieur des cellules au niveau d'une structure dont la nature exacte n'a pu être définie (non présenté).

B. Etude de la localisation du DGLE chez la forme invasive de *Plasmodium berghei* produite par l'Anophèle

Les études sur phase érythrocytaire de *P. falciparum* suggèrent que la présence et la localisation de DGLE varie avec le stade parasitaire, jusqu'aux cellules sexuées. Existe-t-il une évolution particulière au cours des stades parasitaires chez le moustique ? Un immunomarquage en présence de l'anti-DGDG2 a été réalisé sur des sporozoïtes de *Plasmodium berghei* (  chantillon procuré par Catherine Bourgain, Institut Pasteur, Paris) dans des conditions de fixation et d'incubation semblables à celles employées pour les stades érythrocytaires de *P. falciparum* (voir [Matériel et Méthodes](#)).

Figure 33 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG chez le sporozoïte de *Plasmodium berghei*. Le marquage en présence de l'anticorps anti-DGDG2, révélé à l'aide d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorophore rouge profond Cy5 indique la présence de l'épitope chez cette forme invasive produite par l'anophèle.



Les résultats d'observation des lames en immunofluorescence indirecte valident la présence de DGLE chez les sporozoïtes, formes libres invasives du parasite, transmises par le moustique Anophèle (ce stade parasitaire possède la capacité de glissement -gliding-, favorisé par la présence d'un complexe interne membranaire très développé).

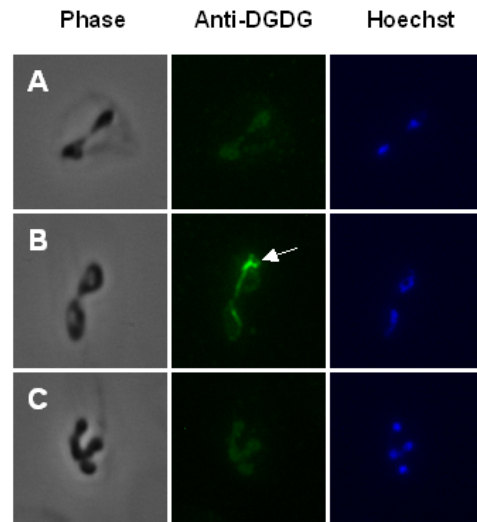
En conclusion, chez *Plasmodium*, le DGLE, un épitope reconnu par une série d'anticorps dirigés contre le DGDG, a pu être détecté chez la totalité des stades érythrocytaires comme chez le sporozoïte. Il est donc présent sur tous les stades que nous avons étudiés, et probablement sur l'ensemble des stades du cycle parasitaire.

C. Etude comparative en immunofluorescence indirecte chez d'autres groupes d'Apicomplexes

1. *Babesia divergens* (Haemosporidae)

Des expériences de localisation de l'épitope reconnu par les anticorps anti-DGDG1 et anti-DGDG2 ont été menées sur *B. divergens* par immunomarquage (protocole similaire à celui utilisé pour marquer des cellules de *Plasmodium* avec l'anticorps primaire et visualisation grâce à un anticorps secondaire couplé avec le Fluorescéine Iso Thio Cyanate (FITC). Le parasite est de taille plus petite que *Plasmodium* (1,5 x 0,5   m). Les structures marquées par l'anticorps anti-DGDG2 s'avèrent donc plus difficiles à caractériser finement par des techniques classiques d'immunofluorescence.

Figure 34 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG chez *Babesia divergens*. (A) Parasite au stade 2 mérozoïtes. L'épitope est détecté par un signal peu intense, assez diffus et légèrement périphérique. (B) Parasites en cours de fission binaire. L'épitope est localisé en périphérie du parasite, apparemment plus intensément au niveau de l'apex. (C) Parasite au stade 4 mérozoïtes après fission. L'épitope est localisée à nouveau de manière diffuse dans les cellules.



Lors de la fission binaire de *Babesia*, le DGLE semble se distribuer en périphérie du parasite dans la zone apicale (Figure 34 B, flèche blanche). Ce marquage indique que le DGLE est vraisemblablement impliqué dans un processus membranaire apical lors de la fission binaire du parasite.

2. *Toxoplasma gondii* (Coccidia)

En complément de l'étude réalisée par C. Botté au laboratoire PCV et à l'Institut Jean Roget, Grenoble (équipe de C. Mercier, M.F. Cesbron), j'ai réalisé une série d'immunomarquages au moyen des anticorps anti-DGDG1 et anti-DGDG2 chez *T. gondii*. La taille des formes invasives excède de 3 à 4 fois celle de *P. falciparum* et *T. gondii* paraît être un modèle d'étude plus aisée pour nombre d'expérimentations biologiques. Des parasites infectieux ont été mis en contact avec des fibroblastes humains (human foreskin fibroblast ou HFF) cultivés sur lamelles. Rapidement, l'invasion des cellules humaines a lieu, attestée par la formation de vacuoles parasitophores contenant un parasite. Les parasites se dupliquent dans la vacuole par un processus d'endodyogénie qui voit la formation de deux parasites fils à partir d'une cellule mère. Dans les 12 heures suivant l'infection, on observe principalement des vacuoles contenant 2 à 4 parasites. Après marquage en présence des anticorps anti-DGDG1 et anti-DGDG2 (visualisable grâce à un anticorps secondaire couplé au FITC) puis traitement en présence de l'intercalant de Hoechst, le signal émis en immunofluorescence indirecte est observé (Figure 35).

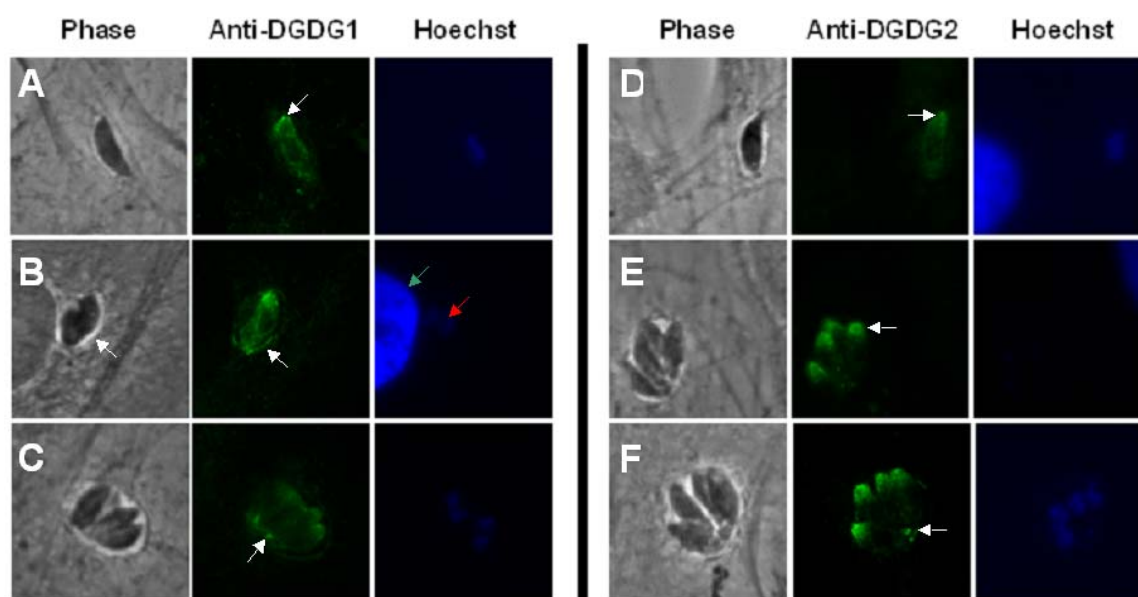


Figure 35 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG chez *Toxoplasma gondii* par les anticorps anti-DGDG1 et anti-DGDG2. Des parasites ont été déposés sur lamelles de fibroblastes humains de type HFF. Les préparations ont été marquées avec un anticorps anti-DGDG puis le réactif de Hoechst, intercalant permettant de visualiser l'ADN nucléaire. **(A-C) Marquage à l'anti-DGDG1.** (A) Un marquage cytoplasmique diffus et un signal plus intense indiquent une localisation au niveau apical (flèche blanche). (B) Un marquage significatif de la vacuole parasitophore (flèche blanche) indique vraisemblablement un signal non spécifique. L'intercalant de Hoechst permet de localiser l'ADN nucléaire des fibroblastes (flèche verte) et des parasites (flèche rouge). (C) Sur certains parasites, le DGLE semble en partie localisé au niveau du corps résiduel, basal, reliant les parasites après duplication (flèche blanche). **(D-F) Marquage à l'anti-DGDG2.** (D-E) L'épitope est localisé à l'apex du parasite (flèche blanche). (F) Le corps résiduel basal (flèche blanche) semble marqué chez quelques parasites ayant subi une ou plusieurs endodyogénies.

Les deux anticorps conduisent à un même marquage d'une structure apicale du parasite, en dépit d'un bruit de fond incluant notamment un marquage de la vacuole parasitophore, ainsi qu'un signal cytoplasmique diffus observé lors de l'utilisation de l'anticorps anti-DGDG1. Le marquage à l'aide de l'anticorps anti-DGDG2 montre une plus grande spécificité : en effet, aucun signal n'est détecté au niveau de la membrane parasitophore ; un signal paraît au niveau de la zone sous-membranaire apicale des parasites comparable à celui observé avec l'anti-DGDG1, mais plus intense.

Des images en forme de « M », caractéristiques de la multiplication des cellules parasitaires par endodyogénie, ont aussi pu être observées (résultats non présentés), où l'apex de la cellule mère ainsi que ceux des cellules filles sont marqués chez des parasites en cours de division. Ces résultats sont en accord avec les travaux similaires du laboratoire (Botte *et al.*, 2008) et indiquent une localisation probable de l'épitope au niveau du complexe interne membranaire, structure impliquée dans les duplications endodyogéniques chez *T. gondii* (Figure 36).

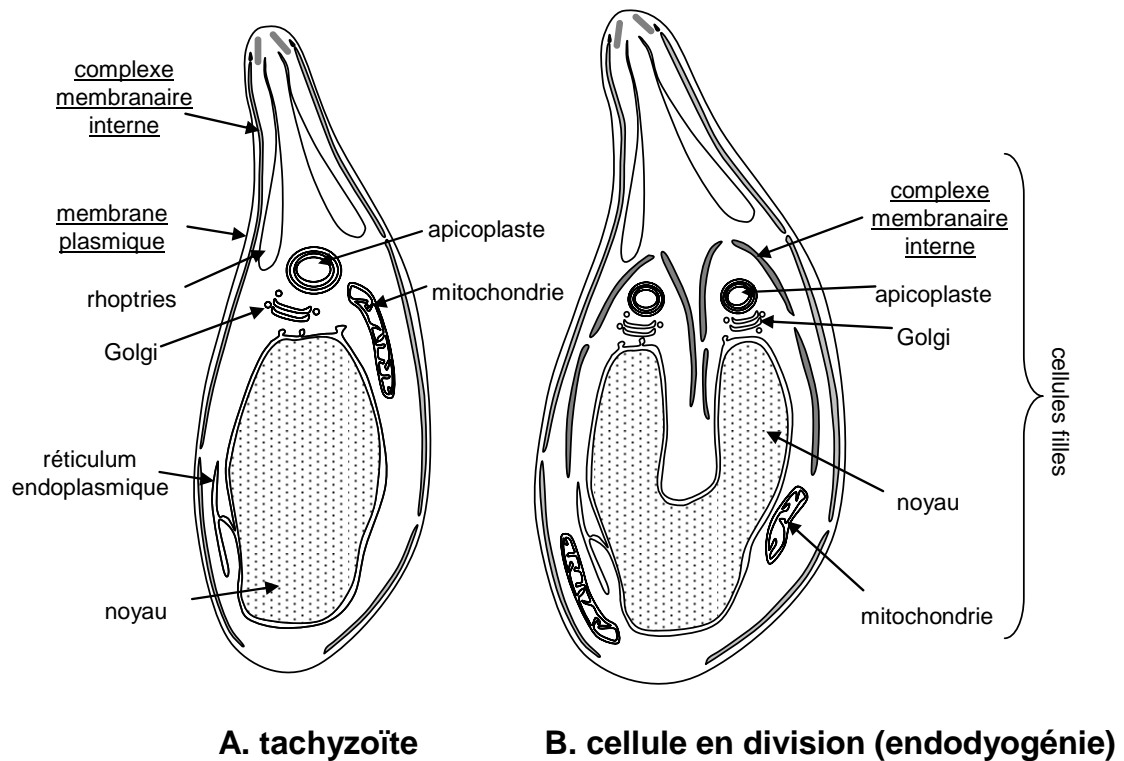


Figure 36 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG chez *Toxoplasma gondii*. Les structures membranaires associées au DGLE sont soulignées. Un marquage apical et périphérique est observé chez les formes intracellulaires de *T. gondii* (A). Le marquage du complexe membranaire interne, qui est dupliqué chez les deux cellules filles en formation au cours de l'endodyogénie (B) est détecté par un marquage en « M ».

L'hypothèse de présence de galactolipides dans les membranes apicoplastiques n'est pas soutenue après examen de cellules, et détection de l'apicoplaste en intensifiant le signal émis par l'intercalant de Hoechst (résultat non présenté). Il est possible que les membranes les plus internes de l'apicoplaste contiennent des galactolipides, mais que cette localisation ou que l'exposition des têtes polaires dans ce système membranaire soient incompatibles avec le marquage ; il est aussi possible qu'aucun lipide réagissant avec les anticorps ne soient présent dans ces membranes. Le marquage du DGLE chez *T. gondii* est proche de celui observé chez *Babesia divergens* et suggère une implication de l'épitope dans un processus membranaire apical lors de la fission binaire du parasite.

Afin de localiser plus finement le DGLE chez *T. gondii*, nous avons souhaité passer à l'échelle de l'observation par microscopie électronique. Pour cette analyse chez *T. gondii*, plusieurs séries d'expériences de marquage en présence des anticorps anti-DGDG (anti-DGDG1, anti-DGDG2 et anti-DGDG3) ont ainsi été tentées sur coupes ultra-fines d'échantillons inclus en résine LR white ou sur échantillons congelés. Les coupes ont été incubées avec l'anticorps et le marquage secondaire a été réalisé à l'aide de protéine A couplée à des particules d'or. Les coupes ont alors été observées en microscopie électronique. Aucune particule d'or n'a pu être localisée ni au niveau de l'apicoplaste, ni au niveau du complexe membranaire interne. L'absence de marquage observable n'exclue cependant pas la présence de l'épitope au niveau de ces structures, et pose à nouveau la question de la disponibilité de l'épitope dans les conditions de fixation, de perméabilisation et d'inclusion testées.

Seuls des marquages de rhoptries et du conoïde (il est à noter que *P. falciparum* ne possède pas de conoïde) étaient visible sur certaines coupes, mais ces marquages semblent dus à une réaction non spécifique de la protéine A couplée aux particules d'or avec un composant des rhoptries.

Une technique alternative a consisté à inclure en résine des membranes de *T. gondii* fracturées par sonication après leur fixation et leur marquage à l'anti-DGDG2 puis à la protéine A couplée à des particules d'or. L'observation en microscopie électronique des coupes réalisées sur ces échantillons a révélé des résultats contradictoires d'une expérience à l'autre (des marquages notamment de la membrane plasmique, du conoïde) rarement reproductibles.

Des travaux complémentaires réalisés par R. Mondragon à l'université de Mexico ont permis toutefois d'observer un marquage périphérique vraisemblablement associé à la membrane plasmique, cohérents avec les observations en microscopie à épifluorescence (Botte *et al.*, 2008).

En comparant l'ensemble des résultats d'immunomarquage obtenus avec les anticorps anti-DGDG1 et anti-DGDG2 chez les Apicomplexes *T. gondii* (Figure 37 A et 37 D), *B. divergens* (Figure 37 B et 37 E) et *Plasmodium* (Figure 37 C et 37 F), organismes proches d'un point de vue ultrastructural, des points communs sont observés chez les trois Apicomplexes.

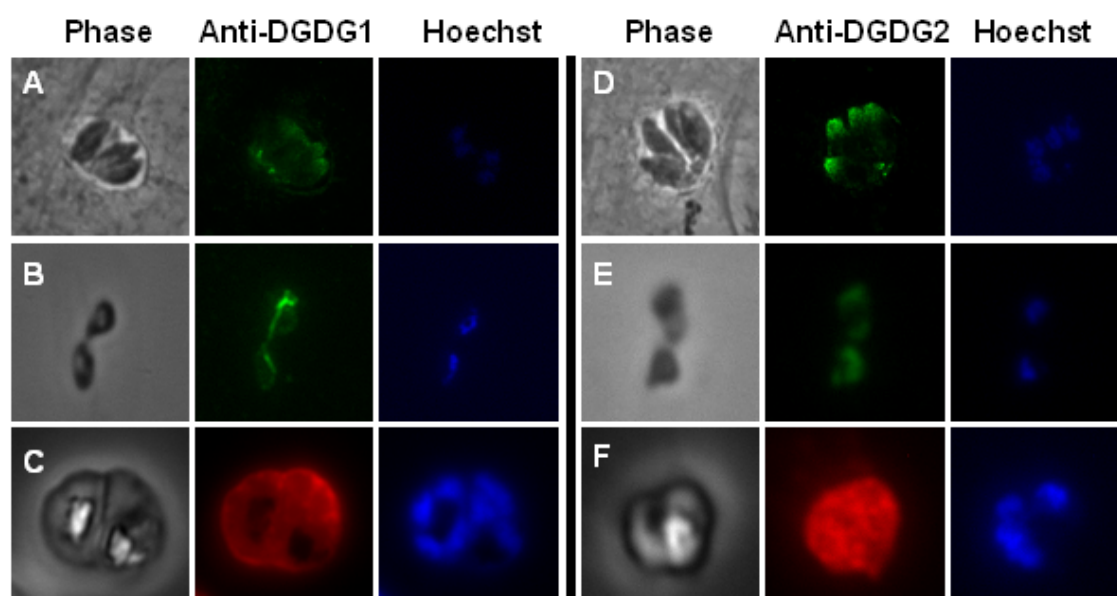


Figure 37 : Localisation d'un épitope de structure proche du DGDG chez *Toxoplasma gondii*, *Babesia divergens* et *Plasmodium falciparum*. (A-C) Marquage à l'anti-DGDG1. (D-F) Marquage à l'anti-DGDG2. (A et D) Chez *T. gondii*, le signal est essentiellement apical. Sur certains parasites, l'épitope semble localisé au niveau du corps résiduel, basal, reliant les parasites après duplication. Le bruit de fond avec l'anti-DGDG2 est réduit par rapport à l'anti-DGDG1, qui présente un marquage significatif de la vacuole parasitophore vraisemblablement non spécifique. (B et E) *B. divergens* au stade 2 mérozoïtes. L'épitope est localisé en périphérie du parasite, plus intensément au niveau de l'apex. (C et F) *P. falciparum* au stade schizonte. L'épitope se distribue en périphérie des futurs mérozoïtes en formation.

L'épitope semble en effet distribué de façon analogue chez les différents parasites (signal périphérique, plus marqué au pôle apical), comme le montrent les immunomarquages réalisés par les différents anticorps anti-DGDG.

L'absence de complexe interne membranaire chez les parasites les plus jeunes (stades anneaux) soulève la question de la structure membranaire marquée.

II. Identification et analyse préliminaire d'un transporteur d'UDP-galactose putatif, protéine potentiellement impliquée dans la synthèse de lipides galactosylés chez *P. falciparum*,

A. Identification d'un gène codant pour un transporteur putatif d'UDP-galactose par analyses bioinformatiques

Au cours de nos recherches de gènes de *P. falciparum* potentiellement homologues de gènes impliqués dans la synthèse de galactolipides, soit par analyse de l'annotation automatique proposée par le consortium PlasmoDB, soit par comparaisons de séquences par méthodes conventionnelles de bioinformatique (veille régulière des données génomiques), nous avons repéré un gène codant pour un transporteur putatif d'UDP-Galactose dans le génome de *P. falciparum* (accession ATCC : PF11_0141). Le polypeptide correspondant de 343 amino acides est prédit contenir 8 domaines transmembranaires (selon un modèle de Markov caché et un profil d'hydropathie de Kyte et Doolittle, déterminés au cours de l'annotation structurale automatique des gènes par le consortium PlasmoDB, <http://plasmodb.org/>) et une séquence N-terminale compatible avec un ancrage au réticulum selon la prédiction du serveur SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, probabilité de 0.949). Une séquence d'adressage (séquence signal) au réticulum est attendue pour un transporteur d'UDP-Galactose (habituellement localisés au niveau de la membrane du RE ou de l'appareil de Golgi). Cette protéine a pourtant été classée parmi les transporteurs de la mitochondrie et de la vacuole digestive (Malaria Metabolic Pathways, <http://sites.huji.ac.il/malaria/>), suivant des méthodes alternatives d'analyses bioinformatiques et est supposée assurer le transport de l'UDP-Galactose en contre-transport de l'UMP. Un modèle cristallographique, basé sur la structure du canal à ammonium AmtB d'*E. coli* (accession PDB 1u7g) a été déduit (Figure 38).

Selon une étude du profil d'expression, le gène PF11_0141 semble régulé de façon négative en cas d'augmentation de la température (Oakley *et al.*, 2007).

En absence de données moléculaires et fonctionnelles plus précises, il nous paraît donc important d'établir d'une part la localisation exacte du produit du gène dans la cellule de *P. falciparum* et d'autre part de déterminer le rôle fonctionnel pour la biologie du parasite.

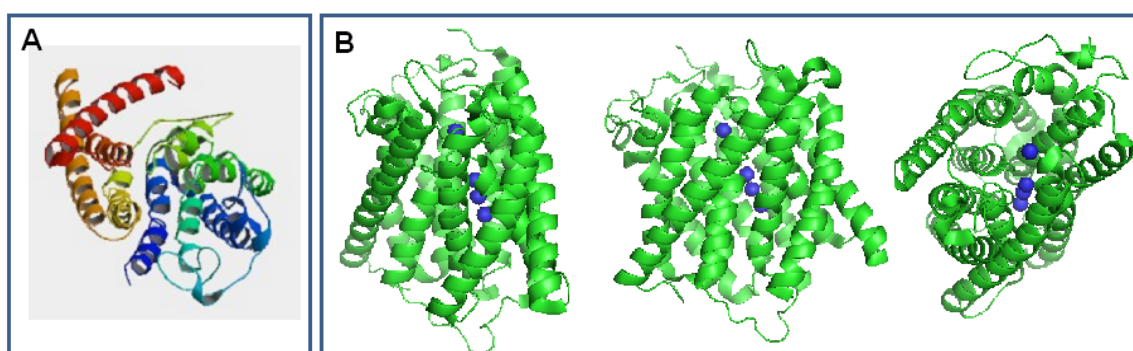


Figure 38 : Modèle de structure cristallographique du transporteur d'UDP-galactose (Accession PF11_0141) déduit de la structure cristallographique du canal ammonium AmtB de *E. Coli* disponible sur <http://modbase.compbio.ucsf.edu>. (A) Transporteur d'UDP-Galactose. (B) Monomère du canal ammonium AmtB (*E. coli*). En bleu sont représentés les atomes d'azote de 4 molécules d'ammonium.

B. Constructions géniques pour l'expression stable ou l'inactivation par knock out du gène PF11_0141 chez *P. falciparum*

1. Surexpression  pismale stable d'un transgène codant pour un transporteur putatif d'UDP-galactose en fusion avec la protéine fluorescente GFP.

La séquence nucléique du gène PF11_0141 a été amplifiée par PCR et intégrée dans le vecteur pACPI de type pENTR/D-TOPO en remplacement de la séquence codant le système d'adressage bipartite de la protéine ACP selon les techniques conventionnelles de biologie moléculaire. Les plasmides pUDPGaIT-GFP^{Hsp} et pUDPGaIT-GFP^{CRT} ont alors été produits par recombinaisons entre 4 plasmides ([Matériel et Méthodes](#)). Après clonage en système bactérien, l'ADN plasmidique a été isolé et analysé par restriction HindIII.

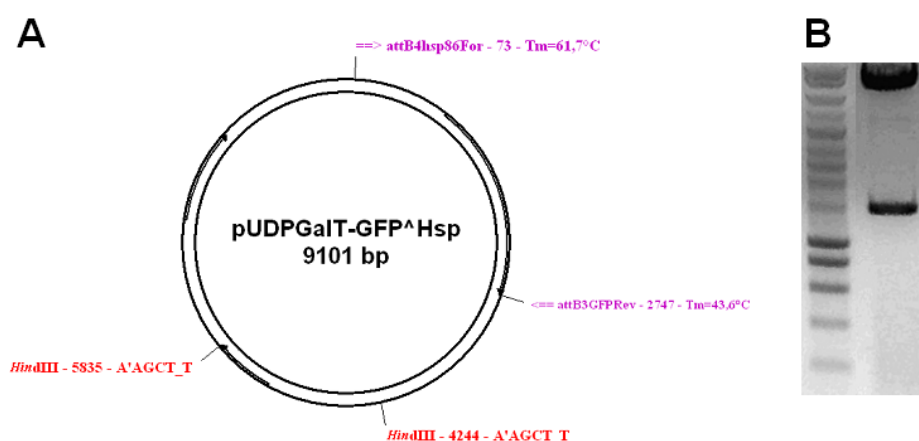


Figure 39 : Construction du vecteur pUDPGaIT-GFP^{Hsp} pour l'expression  pismale stable d'un transgène codant pour un transporteur putatif d'UDP-galactose en fusion avec la protéine fluorescente GFP (A) Schéma du plasmide pUDPGaIT-GFP^{Hsp}. Le vecteur a été obtenu après recombinaison par stratégie Multisite Gateway (Invitrogen).. (B) Analyse de la digestion par l'enzyme de restriction HindIII du plasmide pUDPGaIT-GFP^{Hsp}. La séparation des fragments d'ADN digérés sur gel d'agarose 0,8% montre la présence de fragments de tailles identiques aux tailles attendues (2 fragments de 7510 et 1591 pb).

La Figure 39 représente le schéma et l'analyse de restriction par HindIII du plasmide pUDPGaIT-GFP^{hsp} (le plasmide pUDPGaIT-GFP^{CRT} n'a pas permis de sélectionner de parasites transgéniques et n'est donc pas présenté dans ce travail). La séparation électrophorétique sur gel d'agarose des fragments de digestion par HindIII du plasmide permet d'isoler deux fragments d'ADN de tailles compatibles avec celles des fragments théoriques attendus pour pUDPGaIT-GFP^{Hsp} (2 fragments de 7510 et 1591 pb). Ces résultats ont été confirmés par séquençage.

Le plasmide validé par séquençage a été utilisé pour la transfection de parasites de lignée 3D7 (Matériel et Méthodes). Les parasites sélectionnés par le WR99210 ont été maintenus en culture en présence de la molécule et analysés par PCR en présence des oligonucléotides attB4hsp86For et attB3GFPRRev (Figure 40).

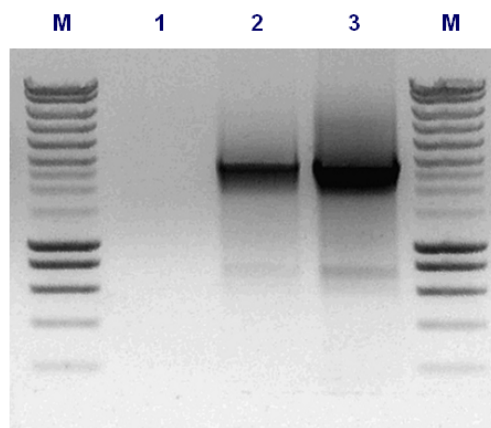


Figure 40 : Analyse par PCR de présence épisomale du plasmide pUDPGaIT-GFP^{hsp86} dans une culture transfectée de lignée 3D7 de *P. falciparum*. (Puits 1) Contrôle négatif : analyse par PCR réalisée sur 100 ng d'ADN (génomique) extrait de parasites *P. falciparum* de lignée 3D7. Aucun fragment d'ADN n'est amplifié, montrant l'absence d'épisome. (Puits 2) Analyse par PCR réalisée sur 100 ng d'ADN (génomique et épisomal) extrait de parasites *P. falciparum* de lignée 3D7 sélectionnés pour leur résistance à la WR 99210 conférée par l'expression de la DHFR (Dihydrofolate réductase) humaine. Un amplicon de taille attendue (2674 pb) est séparé sur le gel d'agarose 0,8%. (Puits 3) Contrôle positif : analyse par PCR réalisée sur 5 ng de plasmide purifié pCHD/UDPGaIT-GFP^{hsp86}. L'amplicon observé est bien de même taille que celui observé sur 3D7 transfectée avec le plasmide pur. (M) Marqueur de poids moléculaire, Smart DNA Ladder (Eurogentec).

Comme le montre la Figure 40, l'ADN matrice constitué par l'ADN génomique de lignée 3D7 de *P. falciparum* ne permet pas d'amplifier le fragment d'ADN compris entre les sites de recombinaison attB4 et attB3, au contraire des ADN matrices constitués par l'ADN extrait de la culture transfectée avec l'ADN du plasmide pUDPGaIT-GFP^{Hsp} et l'ADN plasmidique pUDPGaIT-GFP^{Hsp}. Ceci démontre que le plasmide pUDPGaIT-GFP^{Hsp} est maintenu sous forme épisomale dans le noyau du parasite.

2. Invalidation du gène codant pour le transporteur putatif d'UDP-galactose chez *P. falciparum* par knock out

Une construction pour l'invalidation par knock out (KO) du gène codant pour le transporteur putatif d'UDP-Galactose a par ailleurs été réalisée en utilisant le système pCamBSD (Calmoduline-

Blasticidine) (Sidhu *et al.*, 2005). Ce système permet l'interruption d'un gène par simple recombinaison et l'insertion d'une cassette de résistance à la blasticidine (Matériel et Méthodes).

Des parasites transfectés avec succès avec une construction permettant le knock out du gène codant pour le transporteur d'UDP-Galactose ont pu être obtenus sous pression de l'antibiotique de sélection blasticidine. Les parasites électroporés ont été soumis à 3 cycles de 3 semaines de culture en présence-absence de drogue de sélection, afin d'appauvrir la population de parasites exprimant la construction de façon épisomale et de sélectionner les intégrants stables. Des analyses ont été réalisées par PCR à l'issue de chaque cycle. Un clonage en microplaque P96 a ensuite été réalisé.

C. Contrôle de l'expression

Afin de démontrer l'expression épisomale stable du transporteur d'UDP-Galactose fusionné à la GFP, des Western Blots ont été réalisés sur des extraits parasitaires (de 5.10^7 parasites). Deux anticorps dirigés contre la GFP (souris anti-GFP 1/2500 et lapin anti-GFP 1/2500) ont été utilisés et permettent de mesurer une expression de la protéine fusionnée à la GFP (non montré). Ces expériences vont être reconduites afin de confirmer ces résultats. De plus des expériences préliminaires d'observation microscopique en épifluorescence (sur échantillons non fixés) ont permis d'observer l'expression de GFP au niveau d'une structure tubulaire compatible avec une expression mitochondriale. Des comarquages vont être réalisés afin de confirmer ces premières observations.

Les parasites transfectés avec la construction permettant l'interruption de l'expression du transporteur d'UDP-Galactose ont été analysés par PCR. Parmi les parasites clonés en microplaque P96, et résistants à l'action de la blasticidine, aucun n'a présenté d'interruption du gène codant le transporteur d'UDP-Galactose (résultats non présentés).

III. Expression exogène d'un gène codant pour une MGDG synthase de plante chez *P. falciparum*

Les recherches menées sur le génome de *P. falciparum* n'ont pas permis à ce jour d'identifier une séquence codant pour des homologues des enzymes de synthèses de galactolipides chloroplastiques. Malgré nos efforts pour tenter de caractériser le MGDG chez les parasites Apicomplexes, nous avons apporté des éléments en faveur d'une synthèse de galactolipides chloroplastiques chez les parasites, mais nous n'avons pas apporté de démonstration analytique conclusive. La question de la possibilité d'une synthèse de galactolipides dans l'apicoplaste ou dans un autre compartiment cellulaire n'est donc pas encore résolue de façon définitive.

L'accès et la mise à disposition du substrat UDP-galactose au lieu de la synthèse est une contrainte supplémentaire qu'il est important de poser ici, dans l'hypothèse d'une production de galactolipides confinée dans les membranes les plus internes de l'apicoplaste. Nous avons abordé cette question par l'étude d'un transporteur d'UDP-galactose (voir plus haut). Nous avons par ailleurs entrepris l'expression d'un gène codant pour une activité MGDG synthase de plante, en ayant pris soin d'avoir introduit un domaine d'adressage bipartite à l'apicoplaste, propre à *P. falciparum*. Il s'agirait ainsi de la première transfection réussie d'un gène de plante dans le génome d'un parasite de

l'espèce *P. falciparum*. Une telle lignée parasitaire transgénique devrait permettre d'étudier la disponibilité des substrats dans les membranes les plus internes limitant cet organe. Nous avons choisi pour cette étude la séquence codant pour la MGDG synthase 1 de l'épinard (soMGD1) qui est fonctionnellement bien caractérisée. Le minimum requis pour l'adressage de protéines vers l'apicoplaste de *Plasmodium* a été décrit (Foth *et al.*, 2003) et se compose d'un peptide signal, permettant de traverser les membranes les plus périphériques de l'organe, en amont d'un peptide de transit de type chloroplastique (voir Données Bibliographiques).

A. Constructions géniques pour l'expression d'une forme mature de MGDG synthase végétale adressée à l'apicoplaste de *P. falciparum* et fusionnée à la GFP.

La stratégie de clonage Multisite Gateway (Invitrogen) permet, à partir de trois vecteurs différents codant respectivement pour un promoteur, un gène d'intérêt et une étiquette d'être recombinées avec un vecteur de destination et ainsi créer une construction génique prête à être transfectée. Il est ainsi possible de transfecter une construction combinant (i) un promoteur spécifique de *P. falciparum* (ii) la séquence codant pour la MGDG synthase d'épinard, soMGD1, dont le système d'adressage a été remplacé par un système bipartite d'adressage constitué d'un domaine peptidique de type peptide signal – peptide de transit apicoplastique (iii) une étiquette permettant de localiser la protéine chimérique et ainsi éventuellement valider un adressage apicoplastique (voir Données Bibliographiques).

Un clone d'entrée de type pENTR/D-TOPO codant pour l'ensemble peptide signal – signal d'adressage apicoplastique de la protéine PfACP (van Dooren *et al.*, 2005) a été fourni par l'équipe de GI McFadden (Université de Melbourne, Australie) ainsi que les clones d'entrée codant pour les promoteur PfHsp et PfCRT (promoteur plus faible), GFPmut2 et le clone de destination pcHD-3/4. L'amplification de la séquence codant pour la MGDG synthase d'épinard à compter du codon correspondant à la Leucine 99 (correspondant à la protéine après maturation dans le chloroplaste d'épinard, sans peptide d'adressage chloroplastique), flanquée de sites Ascl, a permis d'intégrer cette dernière en aval du système d'adressage apicoplastique (Matériel et Méthodes). Des bactéries compétentes ont été transformées avec ce plasmide et les clones potentiels d'entrée isolés ont été vérifiés par séquençage.

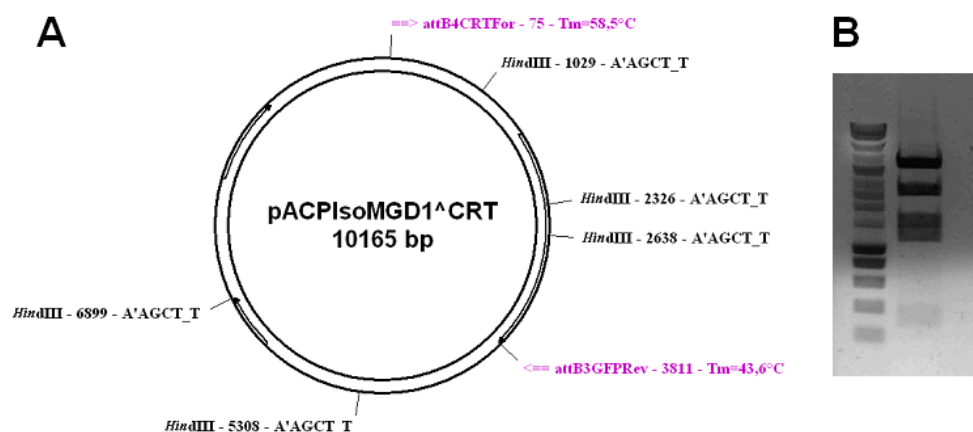


Figure 41 : Construction du vecteur pACPIsoMGD1-GFP^{CRT} pour l'expression d'un gène codant pour une MGDG synthase de plante chez *P. falciparum*. (A) Schéma du plasmide pACPIsoMGD1-GFP^{CRT}. Le vecteur a été obtenu après recombinaison par stratégie Multisite Gateway (Invitrogen). (B) Analyse de la digestion par l'enzyme de restriction HindIII du plasmide pACPIsoMGD1-GFP^{CRT}. La séparation des fragments d'ADN digérés sur gel d'agarose 0,8% montre la présence de fragments de tailles identiques aux tailles attendues (5 fragments de 4295, 2670, 1591, 1297 et 312 pb).

Plusieurs séries de transfections (épisomales stables) de parasites de souche 3D7, avec les constructions présentées sur la Figure 41 contenant la séquence codant pour une MGDG synthase exogène précédée d'un système d'adressage apicoplastique sous contrôle du promoteur *PfHsp86* (promoteur fort) ou *PfCRT* (promoteur plus faible) ont été réalisées.

La Figure 42 montre que la séparation électrophorétique sur gel d'agarose des fragments de digestion par HindIII du plasmide permet de détecter deux fragments d'ADN de tailles compatibles avec celles des fragments théoriques attendus pour pACPIsoMGD1-GFP^{CRT} (5 fragments de 4295, 2670, 1591, 1297 et 312 pb). Ces résultats ont été confirmés par séquençage.

Le plasmide validé par séquençage a été utilisé lors de la transfection de parasites de lignée 3D7 (Matériel et Méthodes). Les parasites sélectionnés par la WR99210 ont été maintenus en culture en présence de la molécule et analysés par PCR en présence des oligonucléotides attB4CRTFor et attB3GFPrev (Figure 42).

Seule une des 5 séries de transfections réalisées (Figure 42) a conduit à l'identification de parasites contenant des épisomes positivement sélectionnés par le gène *hdhfr* (dihydrofolate réductase), marqueur de résistance à la WR99210 (associé à la MGDG synthase de plante). Il s'agit de la construction permettant l'expression de la protéine chimérique soMGD1-GFP sous le contrôle du promoteur *PfCRT*. Une construction destinée à permettre l'expression d'une protéine chimérique soMGD1-GFP sous le contrôle du promoteur *PfHsp* avait été réalisée mais aucune des 5 séries de transfections n'a conduit à l'identification de parasites contenant des épisomes positivement sélectionnés par le gène marqueur de résistance *hdhfr*.

Ces résultats soulèvent naturellement la question de l'importance du promoteur. En effet, le promoteur *PfHsp* est un promoteur fort et ces premiers résultats suggèrent que la sur-expression d'une MGDG synthase exogène chez le parasite pourrait être toxique pour celui-ci.

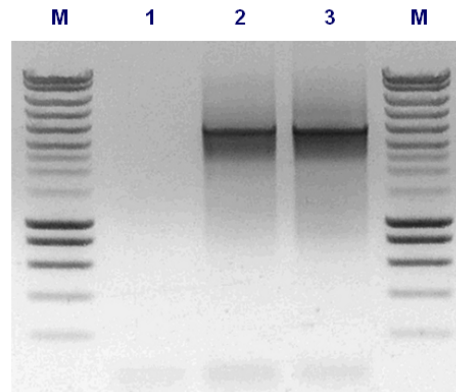


Figure 42 : Analyse par PCR de présence épisomale du plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT} dans une culture transfectée de lignée 3D7 de *P. falciparum*. (Puits 1) Contrôle négatif : analyse par PCR réalisée sur 100 ng d'ADN (génomique) extrait de parasites *P. falciparum* de lignée 3D7. Aucun fragment d'ADN n'est amplifié. (Puits 2) Analyse par PCR réalisé sur 100 ng d'ADN (génomique et épisomal) extrait de parasites *P. falciparum* de lignée 3D7 sélectionnés pour leur résistance à la WR 99210 conférée par l'expression de la DHFR (Dihydrofolate réductase) humaine. Un amplicon de taille attendue (3736 pb) est séparé sur le gel d'agarose 0,8%. (Puits 3) Contrôle positif : analyse par PCR réalisée sur 5 ng de plasmide purifié pACPIMGD1-GFP^{CRT}. L'amplicon observé est bien de même taille que celui observé sur 3D7 transfectée avec le plasmide pur. (M) Marqueur de poids moléculaire, Smart DNA Ladder (Eurogentec).

Comme le montre la [Figure 42](#), l'ADN matrice constitué par l'ADN génomique de lignée 3D7 de *P. falciparum* ne permet pas d'amplifier le fragment d'ADN compris entre les sites de recombinaison attB4 et attB3, au contraire des ADN matrices constitués par l'ADN extrait de la culture transfectée avec l'ADN du plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT} et l'ADN plasmidique pACPIMGD1-GFP^{CRT}. Ceci démontre que le plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT} est maintenu sous forme épisomale dans le noyau du parasite.

B. Contrôle de l'expression

Afin de démontrer l'expression épisomale stable de soMGD1 fusionnée à la GFP, les protéines totales ont été extraites d'une culture de parasites *P. falciparum* (5.10^7 parasites) de lignée 3D7 transfectée avec le plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT} puis positivement sélectionnés pour la présence du plasmide par le gène *hdhfr*, marqueur de résistance à la WR99210, puis séparées sur gel de polyacrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose. L'analyse de l'expression de la GFP, théoriquement fusionnée avec la protéine soMGD1, a été réalisée par immuno-marquage (Western Blot) en utilisant un anticorps primaire dirigé contre la protéine GFP ([Figure 43 A](#)). La protéine entière, non clivée, contenant à sa partie N-terminale une séquence peptidique d'adressage bipartite (constituée d'un peptide signal et d'un peptide de transit), devrait être détectée avec une asse moléculaire de 82 kDa; la protéine après clivage de la séquence peptidique d'adressage bipartite devrait elle être détectée à 75 kDa.

L'expression par des parasites *P. falciparum* de lignée 3D7 transfectée avec le plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT} puis positivement sélectionnés pour la présence du plasmide par le gène *hdhfr* de la protéine soMGD1 en fusion avec la GFP a aussi été analysée en immunofluorescence ([Figure 43 B](#)).

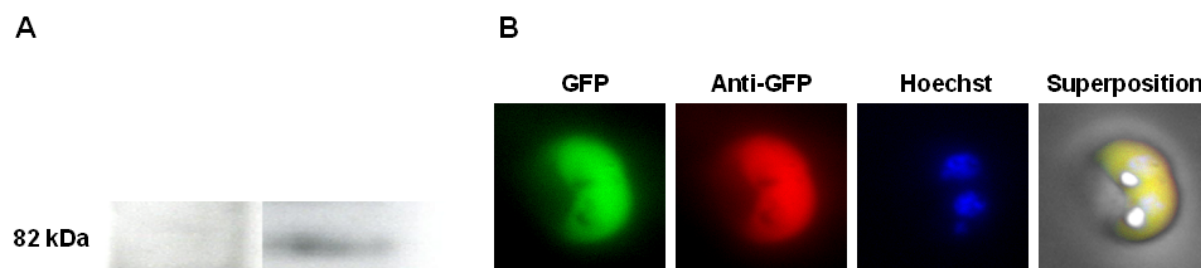


Figure 43 : Analyse de l'expression de GFP par la lignée 3D7 de parasites *P. falciparum* transfectée avec le plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT} puis positivement sélectionnée pour la présence du plasmide par le gène *hdhfr* marqueur de résistance à la WR99210. (A) Analyse par Western Blot des protéines extraites de lignée 3D7 (gauche) en comparaison avec la lignée transfectée (droite) cultivée. L'anticorps primaire, dirigé contre la GFP, réagit avec une protéine de 82 kDa, qui correspond à la taille attendue de la protéine soMGD1 fusionnée à la GFP et possédant la séquence peptidique bipartite d'adressage à l'apicoplaste ACPI. (B) Localisation de la GFP chez un parasite observé en épifluorescence. La fluorescence émise naturellement par la GFP co-localise avec la détection en immunofluorescence indirecte de GFP par un anticorps primaire dirigé contre elle. Elle apparaît être cytoplasmique.

L'anticorps primaire dirigé contre la GFP réagit, chez la lignée transfectée, avec une protéine estimée à environ 85 kDa (en comparaison à la migration parallèle et simultanée de marqueurs colorés de poids moléculaires) après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 43 A). Un tel poids moléculaire est compatible avec la présence d'une protéine entière (82 kDa), non clivée. Ces premières analyses montrent que l'expression de la protéine soMGD1 fusionnée à la GFP est bien viable chez les parasites de lignée transfectée (contrairement aux parasites de lignée 3D7) mais que la séquence bipartite d'adressage vers l'apicoplaste n'est que partiellement ou pas clivée.

La fluorescence de la GFP, comme l'analyse de sa localisation en immunofluorescence indirecte avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la GFP (1/500), indiquent une localisation cytoplasmique de la protéine soMGD1 à laquelle elle est fusionnée (Figure 43 B), confirmant les résultats de l'immuno-marquage. De prime abord, il ne semble pas que les parasites exprimant la protéine soMGD1 en fusion avec la GFP soient morphologiquement différents de parasites de lignée sauvage.

Une analyse plus fine de la localisation de la protéine soMGD1 fusionnée à la GFP reste à être réalisée afin de déterminer si une accumulation plus spécifique dans des organites (en particulier dans l'apicoplaste, les systèmes membranaires) a lieu au cours du cycle parasitaire. Il reste à déterminer si cette enzyme est fonctionnelle.

Après un marquage métabolique à l'UDP-[¹⁴C]Galactose, les lipides de globules rouges sains, ceux de parasites *P. falciparum* de lignée 3D7, ainsi que des parasites de cette même lignée transfectée avec le plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT} et positivement sélectionnés pour la présence du plasmide par le gène *hdhfr* ont été extraits par la méthode de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer, 1959) puis séparés en chromatographie sur couche mince en parallèle de lipides purifiés d'épinard (MGDG et DGDG). Après révélation par autoradiographie d'une part, et coloration aux cristaux d'iode d'autre part on retrouve résultats suivants (Figure 44).

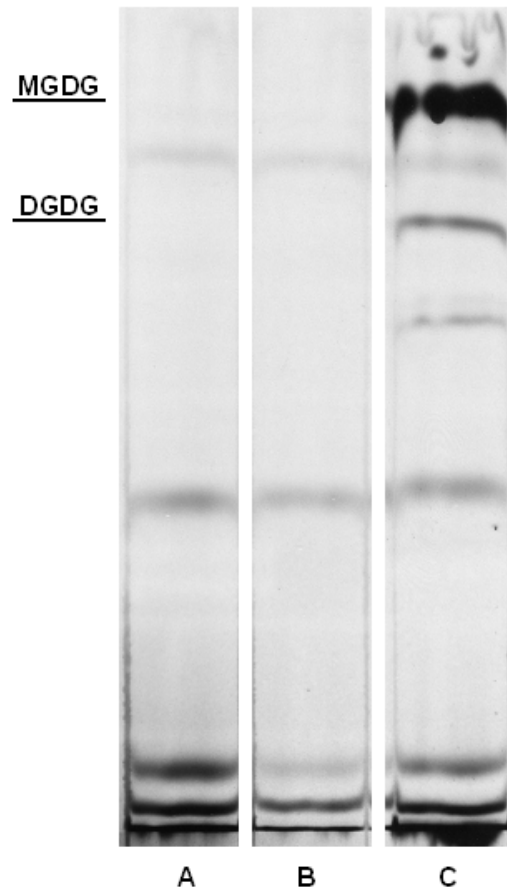


Figure 44: Analyse de lipides séparés en chromatographie sur couche mince après révélation par autoradiographie. La migration des lipides MGDG et DGDG a été déterminée par séparation de lipides purifiés d'épinard sur une piste parallèle. Ces lipides, non radioactifs, sont révélés par coloration par des vapeurs émises par des cristaux d'iode. **(A) Lipides extraits de globules rouges. (B) Lipides extraits d'une culture de parasites de lignée 3D7 de *Plasmodium falciparum*.** Aucune différence significative de profil lipidique n'est observée entre les extraits A et B. L'autoradiographie ne permet pas de détecter de galactolipides ayant les mêmes propriétés chromatographiques que MGDG et DGDG. **(C) Lipides extraits d'une culture de parasites de lignée 3D7 de *P. falciparum* transfectée avec le plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT} puis positivement sélectionnée pour la présence du plasmide par le gène *hdhfr* marqueur de résistance à la WR99210.** L'autoradiographie révèle la synthèse de lipides présentant des propriétés chromatographiques identiques à celles du MGDG et DGDG ainsi qu'un lipides supplémentaire qui reste à être déterminer (vraisemblablement un lipide proche du TriGDG).

L'autoradiographie ne permet pas de détecter de façon significative de galactolipides MGDG et DGDG ayant incorporé de la radioactivité parmi les lipides extraits de la culture de parasites de lignée 3D7. On n'observe pas de différences significatives dans les profils lipidiques des globules rouges et des parasites de lignée 3D7 (Figure 44). Or l'existence de galactolipides dans des cultures de *P. falciparum* et *T. gondii* avait été décrite au cours d'expérimentations précédentes, incubés avec de l'UDP-galactose tritié, marqué au niveau de plusieurs hydrogènes (Marechal *et al.*, 2002). Il s'agit vraisemblablement d'une limite de détection des galactolipides radiomarqués au niveau d'un seul carbone.

Dans les lipides de la lignée 3D7 transfectée, exprimant le plasmide pACPIMGD1-GFP^{CRT}, des lipides radiomarqués comigre avec le MGDG. Nous déduisons de cette détection que l'enzyme soMGD1 exprimée par les parasites est fonctionnelle.

Deux lipides supplémentaires sont détectés, au niveau du DGDG et vraisemblablement du TriGDG. Or les synthèses de DGDG et de TriGDG ne sont pas catalysées par la protéine soMGD1 (Nishiyama *et al.*, 2003). L'expression chez le parasite *P. falciparum* de soMGD1, protéine naturellement produite chez l'épinard, a donc permis de synthétiser du MGDG dans les membranes parasitaires en quantités supérieures à celles existant chez la lignée sauvage 3D7 de *P. falciparum* (indétectables au cours de cette expérience). Ces lipides sont susceptibles d'être substrats de la synthèse de DGDG et de TriGDG par transfert de groupements galactoses depuis des molécules d'UDP-galactose (fournies en excès au cours de l'expérience de marquage métabolique). Il est ainsi mis en évidence qu'une ou plusieurs protéine(s) parasite(s) catalyse(nt) la synthèse de DGDG et de TriGDG, détectables dans des quantités très supérieures aux quantités physiologiques éventuellement présentes chez le parasite. La nature des lipides observés est à confirmer après extraction des lipides, et d'une part résolution en migration sur couche mince à deux dimension, confirmation de la présence d'esters d'acides gras par lyse alcaline et enfin transfert en dot-blot sur une membrane de nitrocellulose puis validation par réaction avec un anticorps anti-DGDG.

Caractérisation et optimisation de composés antipaludiques candidats, dérivés d'inhibiteurs de la synthèse de galactolipides chloroplastiques de plantes

A l'origine du projet décrit dans ce mémoire, il n'existait pas d'inhibiteur qui soit spécifique de l'activité enzymatique des MGDG synthases de plantes et qui soit actif en dessous de la gamme de la centaine de micromolaire. Une recherche d'inhibiteurs de cette activité enzymatique a été engagée par criblage robotisé à haut débit (ou HTS, pour high throughput screening). Le criblage robotisé permet de systématiser la sélection d'inhibiteurs au sein d'une collection de plusieurs milliers de composés (ou chimiothèque). Bien que je n'aie pas contribué au criblage primaire, mes travaux reposent sur cette étude initiale et s'articulent avec les analyses réalisées sur modèle végétal. Ce chapitre intègre donc les travaux antérieurs et les résultats obtenus au cours de ma thèse, en donnant une vision d'ensemble (1) du programme de développement de molécules interférant avec la synthèse des galactolipides chloroplastiques par inhibition des activités des MGDG synthases de plantes et (2) de la caractérisation des composés bioactifs obtenus sur le parasite unicellulaire *P. falciparum* en comparaison aux effets sur d'autres organismes ou lignées cellulaires. Ce chapitre introduit aussi des travaux préliminaires visant à analyser le mode d'action des composés sélectionnés.

I. Criblage pharmacologique visant à sélectionner des molécules inhibitrices de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana*

A. Stratégie de criblage

Les galactolipides représentent jusqu'à 80% des lipides des plastes végétaux. Les représentants majoritaires de cette classe de lipides sont le MGDG (monogalactosyldiacylglycérol) et le DGDG (digalactosyldiacylglycérol). Leur synthèse est assurée par des galactosyltransférases, catalysant tout d'abord le transfert d'un groupement galactosyl d'un donneur UDP-galactose soluble dans l'eau, sur un accepteur lipidique hydrophobe, *i.e.* le diacylglycérol (DAG) pour la synthèse de MGDG. Dans un second temps le transfert d'un galactosyl, toujours à partir d'un donneur UDP-galactose, sur un MGDG préexistant, conduit à un DGDG. La première réaction est catalysée par une famille d'enzymes membranaires, les MGDG synthases (EC 2.4.1.46), classées au sein de la famille GT-28 dans la systématique CAZy (Carbohydrate Active enZyme, <http://www.cazy.org/>). Cette famille comprend notamment la glycosyltransférase MURG (Shimojima *et al.*, 1997), qui catalyse la dernière étape de synthèse du peptidoglycane des parois bactériennes. La seconde réaction est catalysée par les DGDG synthases (EC 2.4.1.241) de la famille GT4. Il est à noter qu'une activité de transgalactosylation, par une galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (GGGT) représente une voie alternative pour synthétiser du DGDG chez les plantes, sans donneur de nucléotide-sucré. Cette activité permettrait la synthèse de DGDG, par simple transfert de galactosyl d'un MGDG à un autre, mais aussi la production de tri- et de tetraGDG dans certaines conditions chez les plantes. Aucun gène codant pour une GGGT n'a été à ce jour caractérisé moléculairement (Benning and Ohta, 2005).

La synthèse de MGDG est le point d'entrée pour la production de l'ensemble des galactolipides, et l'inhibition des MGDG synthases affecte par conséquent l'ensemble de la production de galactolipides. Deux types d'enzymes ont été identifiés: le type A, qui comprend les enzymes *atMGD1* et *soMGD1*, et le type B, qui comprend les enzymes *atMGD2* et *atMGD3* (il existe trois isoformes de MGDG synthase chez *Arabidopsis thaliana* : *atMGD1*, *atMGD2* et *atMGD3*). *atMGD1* est l'enzyme avec laquelle a été établie la stratégie de criblage ([Résultats - Chapitre 2](#)), *soMGD1* est l'enzyme la mieux caractérisée par des travaux de biochimie et d'enzymologie et dont la séquence d'ADN a été transfectée dans le génome de *Plasmodium falciparum* au cours de ce travail ([Résultats - Chapitre 1](#)).

La conservation des MGDG synthases est frappante au cours de l'évolution des végétaux, des Bryophytes aux Angiospermes ([Botte et al., 2005](#)). Les protéines homologues de la synthèse de galactolipides chez les protistes ne sont pas toujours identifiées, malgré des données de génomique importantes (des banques d'EST jusqu'à des séquençages complets de génomes). Il est cependant possible de détecter des gènes codants pour des protéines homologues des MGDG synthases chez des protistes contenant des plastes secondaires limités par plus de deux membranes, par exemple les diatomées, telles que *Thalassiosira pseudonana*.

Chez les plantes, les enzymes de synthèses de galactolipides sont de grande importance dans la biogenèse et le maintien des structures plastidiales. Notamment, *atMGD1* s'avère essentielle à la synthèse des membranes thylakoïdiennes. Indirectement, en tant que constituant des thylakoïdes, et directement, par interaction avec les sous-unités protéiques des photosystèmes, les galactolipides produits sont indispensables pour la fonction photosynthétique ([Kobayashi et al., 2007](#)). Ces propriétés confèrent aux inhibiteurs des enzymes responsables de la synthèse de galactolipides des potentialités d'utilisation comme herbicides. Des propriétés anti-parasitaires additionnelles de tels inhibiteurs sont supposées, suivant l'hypothèse de l'existence d'une activité de synthèse de galactolipides qui soit essentielle pour les parasites Apicomplexes (notamment *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*). Il est aussi possible que des inhibiteurs de la synthèse de galactolipides aient un effet anti-parasitaire en invalidant un processus enzymatique apparenté à la galactosylation du diacylglycérol.

Une chimiothèque a été criblée afin d'identifier des inhibiteurs des MGDG synthases de plantes. La mise au point de la stratégie de criblage et le criblage proprement dit ont été effectués au laboratoire PCV par E. Maréchal, en amont de la réalisation des travaux qui font l'objet de ce mémoire. Les étapes clés en ont été (i) le développement d'une expression inducible de MGDG synthase recombinante active d'un point de vue biochimique, afin de produire une grande quantité de matériel en vue du criblage, (ii) la définition d'un test miniature, reproductible et fiable, (iii) la réalisation du criblage à haut débit robotisé d'une banque de molécules détenue par la société CEREP.

1. Expression inductible d'une forme recombinante de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana*

La réalisation d'un criblage à haut débit robotisé nécessite en premier lieu une grande quantité de matériel biologique de qualité homogène afin de reproduire un grand nombre d'essais qui puissent être comparés d'une micro-plaque à une autre.

L'expression d'une MGDG synthase recombinante d'*Arabidopsis thaliana*, atMGD1, a été induite chez le modèle bactérien *Escherichia coli*. Le développement d'une méthode efficace de purification de l'enzyme recombinante sous sa forme active représente une étape limitante pour le criblage: en effet, lors de l'induction d'une telle expression, 99% de la protéine sont retrouvés accumulés dans les corps d'inclusion, tandis que la forme active de la protéine, associée aux membranes bactériennes ne représente que 1% de la protéine exprimée (Shimajima *et al.*, 1997; Miede *et al.*, 1999; Arai *et al.*, 2001). Il semble que l'expression de l'enzyme chez la bactérie puisse être toxique du fait de l'altération de la topologie membranaire après accumulation de MGDG (Gad *et al.*, 2001).

La préparation de la fraction minoritaire (1%) de l'enzyme membranaire active a donc été réalisée par lyse des bactéries, centrifugation des membranes puis traitement par une phospholipase C non spécifique (extraite de *Bacillus cereus*). Cette phosphatase hydrolyse la tête polaire des glycérophospholipides et génère de ce fait du DAG, le substrat lipidique des MGDG synthases. Les membranes enrichies à la fois en MGDG synthase et en DAG sont homogénéisées par passage à la presse de French et enfin purifiées sur gradient de Percoll.

L'échantillon ainsi obtenu en grande quantité rend possible un criblage automatisé, mais il n'est cependant pas utilisable pour une analyse enzymologique fine. En effet, l'échantillon contenant à la fois la MGDG synthase et des lipides membranaires dont le DAG, il n'est pas possible de faire varier la concentration en DAG. Pour les travaux consécutifs au criblage nécessitant un contrôle de l'apport en substrats, un échantillon solubilisé par un détergent, et purifié par chromatographie est nécessaire (voir plus loin).

Les tests préalables au criblage ont été conduits (i) manuellement au laboratoire PCV, avec mesure du MGDG radiomarké produit après extraction de phase, et (ii) automatiquement par la société CEREP, au format microplaque, avec mesure du MGDG radiomarké séquestré dans les vésicules isolées ensuite par filtration.

2. Mise au point d'un test miniaturisé permettant la mesure automatisée de l'activité MGDG synthase et de son inhibition

La conception d'un essai miniaturisé vise à établir les conditions de l'essai *in vitro* qui sera par la suite réalisé automatiquement. Il s'agit donc d'obtenir un test couramment réalisable en laboratoire et de l'adapter aux contraintes de la réalisation du test en plate-forme robotisée.

Les fractions préparées suivant la méthode décrite ci-dessus (I.A.1) ont été évaluées au laboratoire PCV pour la mesure de l'activité MGDG synthase (Matériel et Méthodes). Du fait que ces fractions sont constituées de vésicules membranaires séquestrant à la fois l'enzyme et un de ses substrats (le DAG), il a été supposé que l'addition du co-substrat (l'UDP-gal) devait permettre une

production de MGDG dans les vésicules. Pour cette validation, les vésicules ont été incubées en présence d'UDP- ^{14}C Gal, radiomarké sur le galactose. La production de MGDG radioactif dans les vésicules collectées par centrifugation ou par filtration sur membrane de $0,45\ \mu\text{m}$ (Millipore, PVDF) a été suivie au cours du temps (Nishiyama *et al.*, 2003). Dans les conditions du criblage (en microplaques dotées de membranes sur lesquels les vésicules sont collectées par filtration), des mesures ont été réalisées en présence d'UDP, un inhibiteur non spécifique, compétitif de l'UDP-Gal, ou de NEM (N-Ethylmaléimide), un réactif des cystéines à l'état réduit. Ce réactif forme une liaison covalente irréversible avec les groupements sulfhydryles (agent pontant des thiols) des MGDG synthases. La Figure 43 montre un exemple de mesure après mise en œuvre du test miniature, permettant de déterminer une CI_{50} (concentration d'inhibiteur pour laquelle l'activité est réduite de moitié).

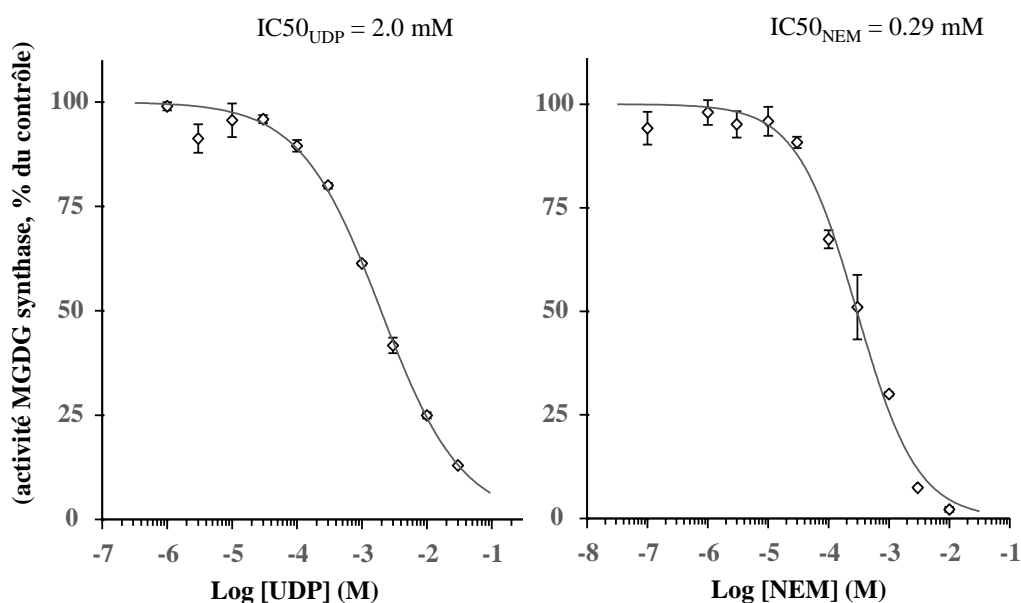


Figure 43 : Mesure de la CI_{50} de l'UDP et du NEM sur l'activité de la MGDG synthase mesurée à l'aide du test miniature mis au point par le laboratoire et la société CEREP (Rueil-Malmaison, France). Suivant ce test, l'UDP possède une CI_{50} (ou IC_{50}) de 2 mM et le NEM une CI_{50} , de 290 μM . Le NEM forme une liaison covalente irréversible avec les groupements sulfhydryls (agent pontant des thiols) des MGDG synthases.

La Figure 43 montre ainsi que le procédé développé permet de mesurer une inhibition de l'activité MGDG synthase par l'UDP (inhibiteur compétitif du substrat UDP-galactose), et par le NEM (inhibiteur se fixant sur le site du DAG). Le procédé mis au point pour la miniaturisation du test de mesure d'activité a été protégé par un brevet mondial (Marechal *et al.*, 2000).

3. Criblage automatisé à haut débit en microplaque

Suite à la mise au point du test miniaturisé, un protocole de mise en œuvre pour criblage à haut débit a été élaboré au sein de la société CEREP (Rueil Malmaison). L'objectif était de tester une chimiothèque de 23360 composés en microplaques, avec un point de réaction par composé, chaque microplaque de 96 puits contenant 80 composés. Les colonnes 1 et 12 de chaque microplaque sont vides et permettent ainsi de caractériser le test et de valider les résultats obtenus en y déposant du

DMSO (pour les contrôles négatifs) ou de l'UDP (pour les contrôles positifs ; compétiteur de référence à la concentration finale de 3.3 mM). Ainsi, la mise en œuvre a nécessité 292 microplaques de 96 puits, soit 28032 mesures de l'activité MGDG synthase (voir Figures 44 et 45).

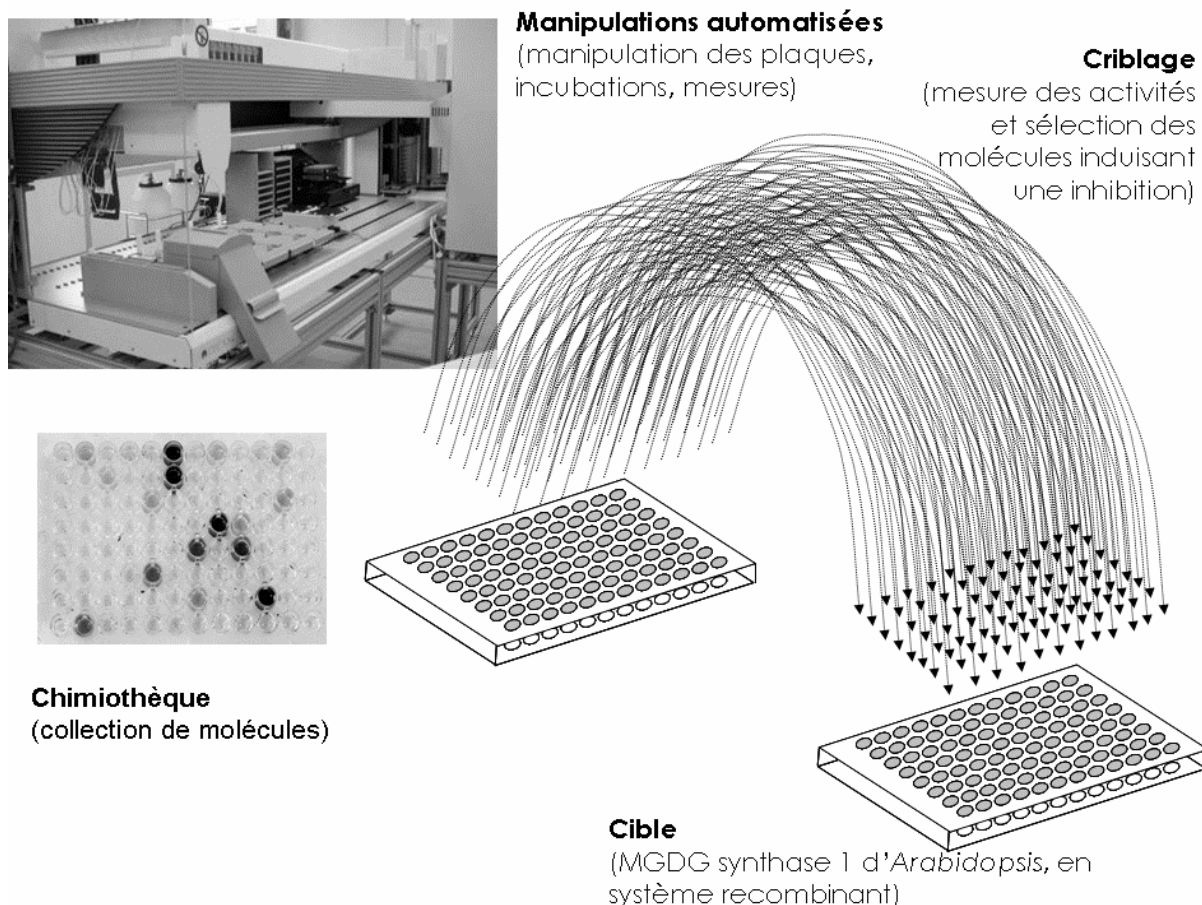


Figure 44 : Principe du criblage automatisé à haut débit, permettant la sélection de composés inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana* (atMGD1), suivant un test d'activité au format des plaques de 96 puits.

On appelle *bioactivité*, l'effet porté par une molécule sur une cible biologique donnée ([Matériel et Méthodes](#)). Ici, une molécule est dite bioactive lorsqu'elle inhibe l'activité de synthèse du MGDG dans les conditions de mesure.

B. Criblage de la chimiothèque : identification de deux molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1

Le criblage primaire d'une chimiothèque de 23360 composés a permis de sélectionner treize composés ayant une activité inhibitrice sur atMGD1 ([Figure 45](#)). Un criblage secondaire de quarante analogues structuraux des treize premiers composés identifiés a consolidé ces résultats : sur les quarante molécules testées, cinq ont été retenues et validées au laboratoire. Cependant, l'inhibition mesurée n'excède pas 50 % de l'activité mesurée en condition contrôle. La mesure de l'inhibition a été donc améliorée en favorisant la déstructuration des membranes (en ajoutant du DAG exogène, des détergents tels que le CHAPS, du phosphatidylglycérol) permettant de mesurer une inhibition allant jusqu'à 90 %, avec toutefois une CI50 augmentée (non présenté).

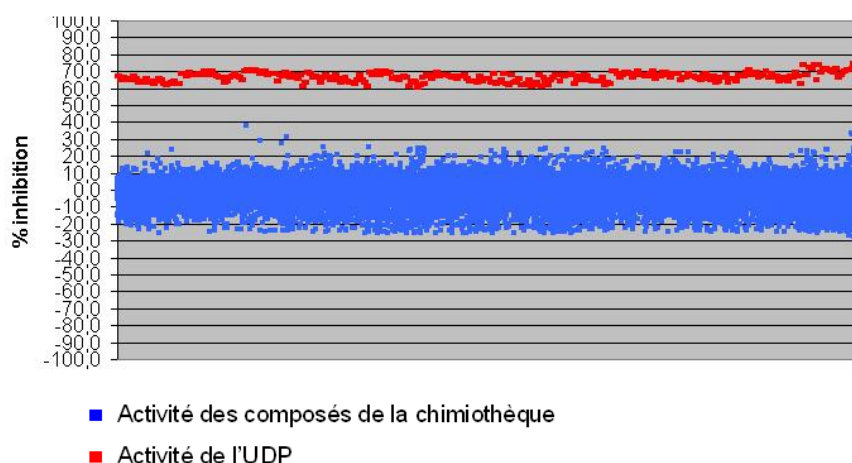


Figure 45 : Bioactivité comparée des composés de la chimiothèque et de l'UDP sur l'activité de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana*. Criblage primaire à haut débit (réalisé par la société CEREP) visant à sélectionner des inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana*, suivant un test de mesure d'activité en présence de vésicules lipidiques enrichies en MGDG synthase et en substrat DAG. Chaque point bleu représente le pourcentage d'inhibition provoqué par addition d'un composé de la chimiothèque (0 % = aucune inhibition) à 10 μ M final, soit 23360 points. Chaque point rouge représente l'activité de l'UDP (3.3 mM), inhibiteur compétitif de référence de la MGDG synthase. Un test contrôle en présence d'UDP est réalisé pour chaque plaque, soit 292 points.

Finalement, deux molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 (le second composé diffère du premier par la présence d'un groupement benzyle) ayant un effet inhibiteur notable sur protéine recombinante α MGD1 ont été identifiées par ce criblage secondaire avec une CI50 inférieure à 100 μ M. Ces molécules (Annexes Tableau 1), ont été retenues en préalable à mes travaux de Thèse, pour être testées *in vivo* sur plantes, algues vertes et des parasites Apicomplexes, *Toxoplasma gondii* (travaux menés par C. Botté à l'Institut Jean Roget, Grenoble), *Plasmodium falciparum* (le travail présenté dans ce mémoire) et les érythroblastes humains.

A1B1C1_1 et A1B1C2_1 présentent des activités inhibitrices très similaires avec des CI50 apparentes, mesurée dans les conditions de criblage sur l'activité d' α MGD1 recombinante, de 12 μ M et 10 μ M respectivement.

Une première étude de l'effet de ces molécules réalisée par C. Botté sur divers organismes a mis en évidence (i) une inhibition des MGDG synthase de plantes (*Arabidopsis*, épinard) avec une CI50 de l'ordre de 10 μ M, (ii) un effet herbicide sur *Arabidopsis thaliana* (plante supérieure) provoquant une inhibition totale de la germination et de la pousse, (iii) un effet algicide sur *Chlamydomonas reinhardtii* (algue verte), (iv) un effet anti-parasitaire sur *Toxoplasma gondii* (Apicomplexe) cultivé *in vitro*, (v) aucune modification morphologique notable de fibroblastes humains cultivés en présence de 10 μ M de molécule (Botte, 2007)

II. Caractérisation enzymologique de l'inhibition des MGDG synthases par A1B1C1_1 et A1B1C2_1, deux molécules initiales sélectionnées par criblage à haut débit.

A. Spectre d'inhibition des molécules sur l'activité des MGDG synthases de plantes supérieures

Le criblage automatisé a été réalisé avant mes travaux de thèse. Les deux composés actifs retenus après criblage ont été testés sur 1) des échantillons de MGDG synthases recombinantes représentant l'ensemble des membres de la famille multigénique d'*Arabidopsis* (*at*MGD1, *at*MGD2 et *at*MGD3) et l'isoforme 1 de l'épinard (*so*MGD1), dans des vésicules membranaires obtenues à partir de bactéries induites, et 2) des échantillons de membranes d'enveloppe chloroplastique, contenant les formes natives des MGDG synthases, fractionnées à partir de feuilles d'épinards (il s'agit pour cet échantillon d'un extrait biologique enrichi en *so*MGD1). Cette étude préliminaire du spectre d'inhibition des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1, sur l'activité de synthèse de MGDG chez les plantes supérieures a montré que :

- L'orthologue de la MGDG synthase 1 chez l'épinard (*so*MGD1) est inhibé tant sous forme recombinante que sous forme native dans l'enveloppe chloroplastique purifiée. Ce résultat illustre d'une part, que l'inhibition n'est pas spécifique de l'enzyme d'*Arabidopsis* et d'autre part, que la forme recombinante et la forme native de MGD1 sont également inhibées.

- Outre *at*MGD1, l'ensemble des isoformes de la famille multigénique d'*Arabidopsis thaliana* (*at*MGD2 et *at*MGD3) est également sensible aux inhibiteurs, ce qui montre que les molécules sélectionnées peuvent avoir un effet sur l'ensemble des activités MGDG synthases d'un organisme.

Les molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 étant en partie hydrophobes, l'addition de DMSO est essentielle. L'addition de détergent CHAPS (nécessaire pour purifier l'enzyme et analyser l'interaction entre molécules et MGDG synthases), provoque globalement une augmentation de la CI50. Au cours du programme d'optimisation de la structure moléculaire des inhibiteurs présenté plus loin, les mesures systématiques de la CI50 pour l'activité de synthèse du MGDG, réalisées sur suspension d'enveloppe de chloroplastes d'épinard, solubilisées par le détergent CHAPS, sont donc sensiblement supérieures.

De plus, malgré l'homologie des MGDG synthases avec les enzymes bactériennes MURG, aucun des deux peptides connus pour inhiber l'activité de MURG, *i.e.* la nisine (CI50_{MURG} de 4 μ M) et la vancomycine (CI50_{MURG} de 18-73 μ M) ([Chandrakala et al., 2004](#)), n'a d'effet sur l'activité de *so*MGD1.

En complément de cette étude, j'ai évalué l'effet des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 pour une gamme de concentrations de 0 à 100 μ g.mL⁻¹ sur la croissance de *Mycobacterium bovis* (qui possède aussi une enzyme MURG) dans les conditions standard de culture ([voir Figure 46](#)).

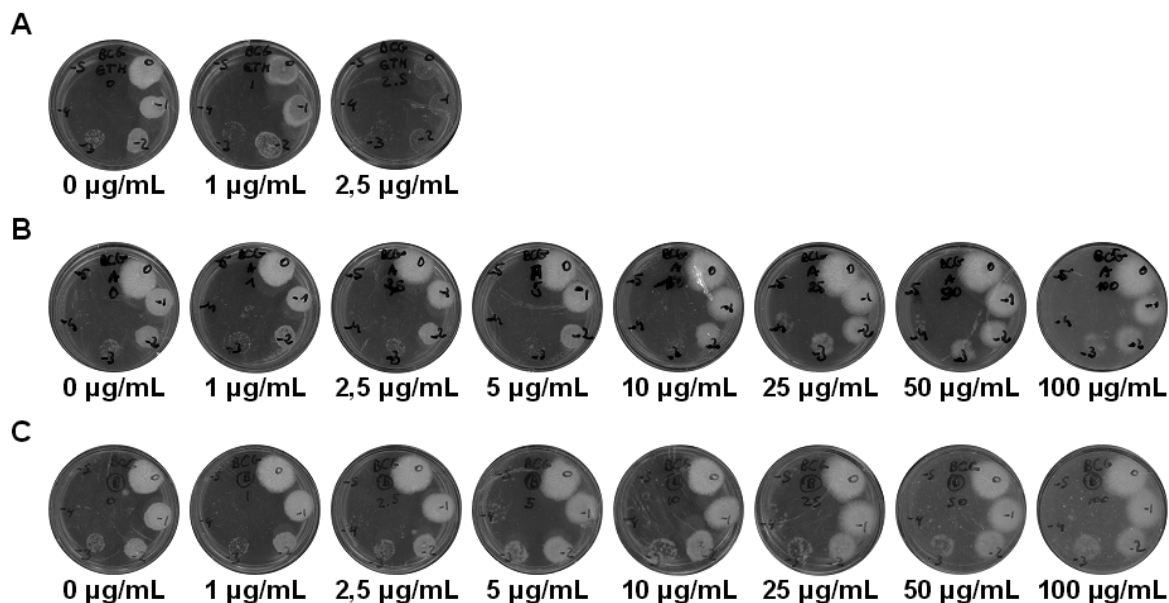


Figure 46 : Effet de l'éthionamide, A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération in vitro de *Mycobacterium bovis* souche bacille Calmette-Guérin (BCG) Pasteur. (A) Contrôle positif Ethionamide (B) A1B1C1_1 (C) A1B1C2_1. Alors que la CMI (concentration minimale requise pour inhiber 99% de la prolifération ; voir [Matériel et Méthodes](#)) mesurée de l'éthionamide est en accord avec les données habituelles (2,5 µg/mL) de *Mycobacterium bovis*, aucun effet toxique n'est mesuré avec les molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1.

La [Figure 46](#) montre qu'aucune inhibition de la croissance des mycobactéries n'a pu être détectée lors des tests réalisés avec les composés A1B1C1_1 ([Figure 46 B](#)) et A1B1C2_1 ([Figure 46 C](#)) par comparaison avec l'antibiotique éthionamide sur une même culture mycobactérienne ([Figure 46 A](#)). De façon similaire, aucune inhibition de la croissance des bactéries *E. coli* (souche DH5α) mises en culture en présence d'une concentration allant jusqu'à 500 µM de A1B1C1_1 et A1B1C2_1 n'a été observée, ce qui indique qu'aucun effet bactéricide par inhibition de MURG ne peut être attribué à ces molécules.

B. Caractérisation de l'inhibition de A1B1C2_1 sur *atfMGD1* et *soMGD1*

Au global, A1B1C2_1 est la molécule qui présente les propriétés inhibitrices les plus larges sur l'ensemble des activités MGDG synthases de plantes évaluées *in vitro*. Ce composé est aussi celui qui inhibe la prolifération de *P. falciparum* avec une CI50 inférieure à 2 µM ([voir plus loin et Tableau 1 en Annexe](#)). A1B1C2_1 a par conséquent été examinée plus finement au niveau enzymologique sur deux formes recombinantes de MGDG synthases particulièrement bien caractérisées au laboratoire PCV, *atfMGD1* et *soMGD1*.

Les MGDG synthases ont deux substrats (le DAG et l'UDP-galactose) qui se fixent sur deux sites distincts selon un mécanisme biréactionnel séquentiel non ordonné ([Maréchal, 1994](#)). Selon ce mécanisme, la fixation d'un substrat ne dépend pas de la fixation préalable du co-substrat. Par ailleurs, la fixation d'un substrat ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour le co-substrat. Il est donc possible de caractériser un inhibiteur de MGDG synthase pour le DAG, en fixant la concentration en UDP-gal et réciproquement ([Figure 47](#)).

Le contrôle de la concentration de substrat DAG nécessite de disposer d'un échantillon enzymatique dépourvu de lipides, ce qui est réalisé par solubilisation de membranes portant l'activité MGDG synthase en présence du détergent CHAPS, et en purifiant l'enzyme par chromatographie sur matrice d'Hydroxyapatite-agarose (Maréchal, 1994). Par ailleurs, le DAG est un lipide non soluble dans l'eau et s'insère dans des micelles mixtes constitués du détergent CHAPS et du phosphatidylglycérol (PG) apporté dans le milieu réactionnel. La concentration de DAG est donc mesurée par la fraction molaire (en mol%), que l'on peut déduire simplement des concentrations molaires (en M) de l'ensemble des molécules amphipatiques (CHAPS, PG et DAG) suivant la formule suivante :

$$[DAG]_{mol\%} = \frac{[DAG]_M}{[CHAPS]_M + [PG]_M + [DAG]_M}$$

La caractérisation de l'inhibition de A1B1C2_1 a été réalisée sur des échantillons de protéines *at*MGD1 et *so*MGD1 recombinantes purifiées par chromatographie sur matrice d'Hydroxyapatite-agarose au laboratoire PCV.

Afin de comprendre la relation éventuelle entre l'activité des inhibiteurs et le fonctionnement des MGDG synthases, nous avons entrepris une caractérisation de l'inhibition

- d'une part en fixant la concentration d'UDP-galactose à 0,3 mM et en apportant des concentrations variables de DAG ($7,46 \cdot 10^{-3}$; $14,9 \cdot 10^{-3}$; $22,2 \cdot 10^{-3}$; $37,0 \cdot 10^{-3}$ et $71,4 \cdot 10^{-3}$ mol%) ;
- d'autre part en fixant la concentration de DAG à $22,2 \cdot 10^{-3}$ mol% et en apportant des concentrations variables d'UDP-galactose (0,055 mM ; 0,139 mM ; 0,277 mM et 0,555 mM).

L'activité enzymatique a ensuite été mesurée pour des concentrations croissantes d'inhibiteur (0, 12, 20 et 40 μ M) comme il est décrit dans le [Matériel et Méthodes](#), avec une mesure 10 minutes et 20 minutes après le début de la réaction, en tripliquât. Les vitesses initiales ainsi déduites, en μ mol de galactose incorporé. $h^{-1}.mg$ de protéines $^{-1}$ ont permis de représenter l'effet de l'inhibiteur en coordonnées inverses (projection de Lineweaver et Burk) ([Figure 47](#)).

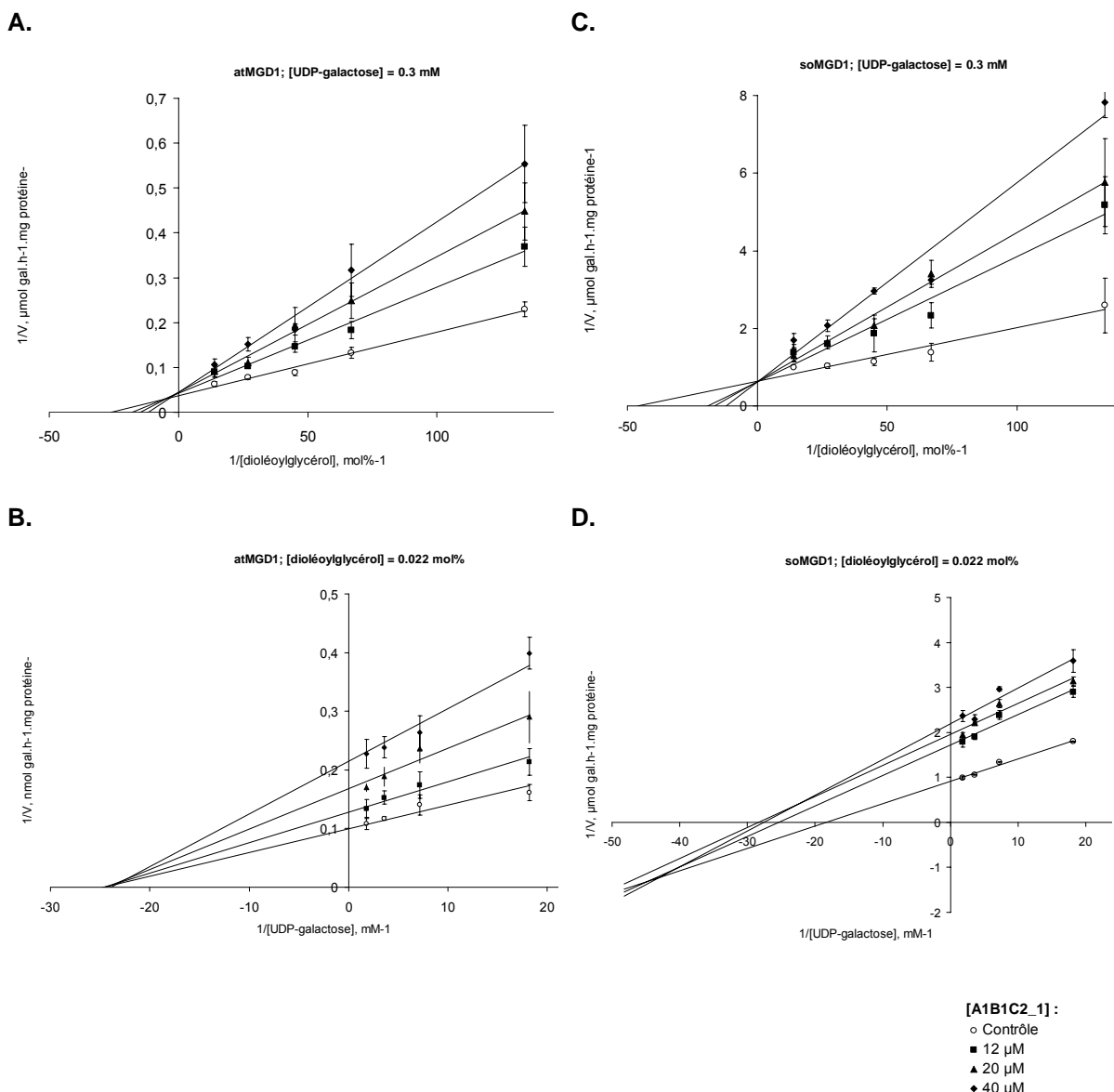


Figure 47 : Inhibitions des MGDG synthases de type 1 d'*Arabidopsis* (atMGD1) et de l'épinard (soMGD1) par la molécule A1B1C2_1. Représentations de type Lineweaver et Burk. La vitesse initiale (V) est exprimée en μmol de galactose incorporé. $\text{h}^{-1}.\text{mg}$ de protéines $^{-1}$; elle est déterminée par la mesure de galactose incorporé dans des prélèvements de 125 μL , réalisés à 10 et 20 minutes, dans un milieu de 300 μL contenant 1,2-dioléoylglycérol et UDP-galactose aux concentrations indiquées; PG 1,3 mM; CHAPS 6 mM; MOPS 50 mM; KCl 0,25 mM; $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,25 M; pH 7,8 et une fraction purifiée obtenue sur colonne d'Hydroxyapatite-agarose, enrichie en MGDG synthase recombinante. (A) et (C) L'activité est mesurée avec des concentrations variables de 1,2-dioléoylglycérol (en mol%) et pour une concentration constante d'UDP-gal (0,3 mM). (B) et (D) : L'activité est mesurée avec des concentrations variables d'UDP-gal (en mM) pour une concentration de surface de 1,2-dioléoylglycérol constante (0,022 mol%).

La Figure 47 montre que pour atMGD1 et soMGD1 à concentration fixe d'UDP-gal et concentration variable de DAG, lorsque la concentration en inhibiteur augmente, l'intersection à l'axe des ordonnées est constante ($1/V_m$) alors que l'intersection à l'axe des abscisses ($1/K_{m\text{apparent}}$) varie : l'inhibition par A1B1C2_1 est donc compétitive pour le substrat DAG (Figure 47A et 47C). Les analyses à concentration fixe de DAG et concentrations variables d'UDP-gal montrent une inhibition non-compétitive par rapport au substrat UDP-gal pour atMGD1 (Figure 47B), et mixte non-compétitive/anti-compétitive pour soMGD1 (Figure 47D).

Nous déduisons de ces mesures qu'A1B1C2_1 agit sur l'enzyme en se fixant essentiellement sur la poche de liaison du DAG pour *atMGD1* et *soMGD1*. A1B1C2_1 ne se fixe pas sur la poche de liaison de l'UDP-gal. Le résultat mixte pour *soMGD1* suggère que la liaison de l'UDP-gal stimule partiellement l'effet inhibiteur, vraisemblablement par un changement localisé de conformation qui favorise la fixation de l'inhibiteur.

Il est donc possible de déduire un K_i pour ces enzymes, relative au site de liaison du DAG, suivant la formule suivante, valable en cas d'inhibition compétitive:

$$K_{m_{app}} = K_m + \frac{K_m[A1B1C1_2]}{K_i}$$

La Figure 48 permet donc une détermination graphique du K_i pour *atMGD1* ($K_{i_{atMGD1}} = 17,2 \mu\text{M}$) et pour *soMGD1* ($K_{i_{soMGD1}} = 12,6 \mu\text{M}$), relative à l'inhibition compétitive pour le substrat DAG.

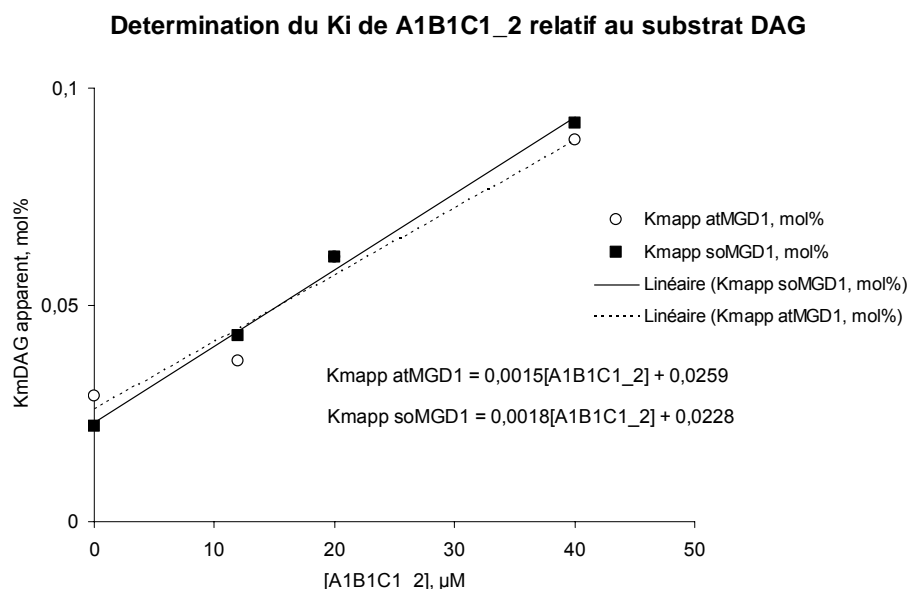


Figure 48 : Détermination de la constante d'inhibition de la molécule A1B1C2_1, inhibant les MGDG synthases 1 d'*Arabidopsis* (*atMGD1*) et de l'épinard (*soMGD1*) par compétition avec le substrat DAG. Le K_m apparent a été déduit des courbes présentées sur la Figure 47, et est exprimé en mol% en fonction de la concentration en inhibiteur. Les formules des régressions linéaires permettent de déduire le K_i .

La compétition pour le DAG suggère une partition de la molécule A1B1C2_1 dans la phase micellaire. Lorsque nous comparons le K_m pour le DAG ($K_{m_{atMGD1}} = 2,59 \cdot 10^{-2} \text{ mol\%}$ et $K_{m_{soMGD1}} = 2,28 \cdot 10^{-2} \text{ mol\%}$) avec le K_i exprimé en mol% ($K_{i_{atMGD1}} = 0,235 \cdot 10^{-2} \text{ mol\%}$ et $K_{i_{soMGD1}} = 0,172 \cdot 10^{-2} \text{ mol\%}$), nous notons que le K_i est 11 à 13 fois plus faible que le K_m , indiquant un fort niveau d'inhibition du composé A1B1C2_1.

C. Etude de l'analogie structurale de A1B1C2_1 avec le diacylglycérol

L'observation de la structure développée de la molécule A1B1C2_1 présentée sur le Tableau récapitulatif (Tableau 1 en Annexes), ne permet pas d'identifier la molécule comme un analogue structural évident du DAG.

Des données structurales sur le site de liaison du DAG chez les MGDG synthases permettraient de comprendre comment A1B1C2_1 occupe la poche de liaison du DAG. Malheureusement, la modélisation de la structure tridimensionnelle des MGDG synthases, basée sur la similarité de séquence avec la protéine MURG d'*E.coli* dont la structure est résolue, n'a pas permis de caractériser la poche de liaison de ce substrat (Botte *et al.*, 2005). Nous avons cependant tenté d'exploiter les informations collectées sur l'ensemble des molécules testées dans ce programme pour évaluer dans quelle mesure A1B1C2_1 pouvait se substituer au DAG.

- Nous avons tout d'abord considéré que chez le DAG, la partie glycérol (avec l'hydroxyl libre en position *sn*-3 du glycérol, sur lequel le galactose est transféré) est particulièrement importante. Les extrémités des longues chaînes carbonées (acyls en positions *sn*-1 et *sn*-3) plongent dans la membrane et ne sont pas à prendre en compte.

- Chez le composé A1B1C2_1, la partie piperidinyldihydro benzoimidazolone est très importante (partie A1B1 de la molécule : l'effet sur la MGDG synthase est souvent perdu lorsque cette partie de la molécule est modifiée).

Une superposition des structures moléculaires de A1B1C2_1 et du DAG a donc été envisagée, en collaboration avec S. Aci (CMBA, CEA Grenoble). Les structures du DAG et de l'inhibiteur A1B1C2_1 ont été dessinées en 2 dimensions à l'aide de l'outil MarvinSketch de la suite MarvinBeans de Chemaxon, puis converties en structures 3D (suite MarvinBeans de ChemAxon). Les principales étapes pour la modélisation structurale et la superposition ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans le [Matériel et Méthodes](#).

Pour le DAG, seule la partie entre accolades présentée sur la [Figure 49](#) a été considérée pour la recherche de conformations stables.

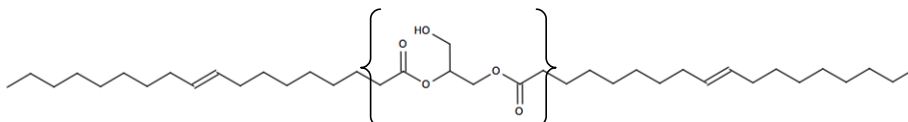


Figure 49 : Région de la molécule de dioléoylglycérol sélectionnée pour simuler la conformation tridimensionnelle superposable au A1B1C2_1. La MGDG synthase catalyse le transfert d'UDP-gal sur le dioléoyldiacylglycérol ainsi que d'autres espèces moléculaires de DAG, variant en longueurs de chaînes de carbones et en désaturations dans les zones non retenues pour la simulation *in silico*.

Puisque l'inhibiteur est sensé occuper une espace moléculaire proche de celui du DAG lorsqu'il est dans sa poche de liaison dans l'environnement protéique que confère la MGDG synthase, une carte de RMSD (Root Mean Square Deviation) correspondant à la dynamique dans un environnement de type protéique a été calculée afin d'évaluer le nombre de conformations stables possibles ([Figure 50](#)).

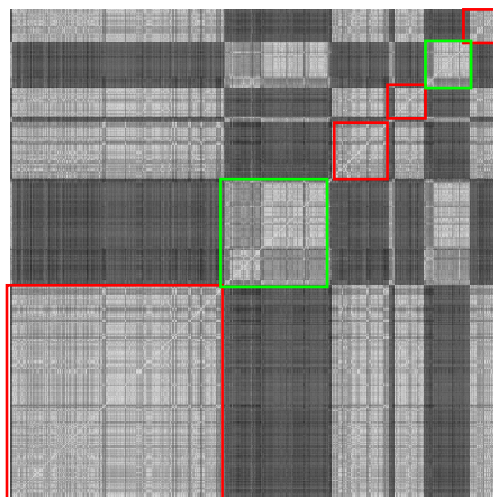


Figure 50 : Identification de deux conformations stables pour le DAG dans un environnement protéique. Une carte de RMSD (Root Mean Square Deviation) correspondant à la dynamique dans un environnement de type protéique a été calculée afin dévaluer le nombre de conformations stables possibles pour le DAG. Le paramétrage a été sélectionné pour un solvant implicite de type GBSA (voir [Matériel et Méthodes](#)), $\text{extdiel}=4.0$, signifiant qu on considère un ϵ_0 pour le solvant de l ordre de 4, correspondant à un environnement type protéine – au lieu de 78/80 qui est le ϵ_0 de l eau). Sur ce type de carte, les carrés blancs représentent des périodes de conformation stable de la molécule étudiée. On peut voir 2 conformations principales pour cette partie de la molécule (quoique la conformation 2 puisse être sous-divisée en 2 autres conformations proches) : en rouge, la conformation 1 ; en vert, la conformation 2.

La [Figure 50](#) permet de détecter 2 conformations principales pour le DAG : en rouge, la conformation 1 ; en vert, la conformation 2. Une structure représentative de la structure la plus proche (en RMSD) de la moyenne de ces ensembles de conformations a été retenue pour les superpositions avec l inhibiteur.

Pour A1B1C2_1, les analyses effectuées sur l ensemble des dérivés moléculaires présentés dans le Tableau récapitulatif ([Tableau 1 en Annexes](#)), indiquent que la partie piperidinyl-dihydro benzoimidazolone est critique pour l effet inhibiteur des MGDG synthèses. Seule la partie entre accolades sur la [Figure 51](#) a donc été considérée pour la recherche de conformations stables.

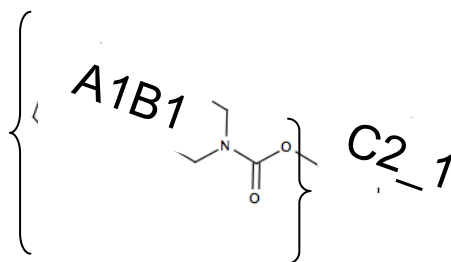


Figure 51 : Région de la molécule A1B1C2_1 sélectionnée pour simuler la conformation tridimensionnelle superposable au DAG. La région entre accolades correspond à la partie A1B1. La structure peut être visualisée en accord préalable avec E. Maréchal, IRTSV PCV

Sur la carte de RMSD correspondant à la dynamique dans un environnement de type protéique, une seule conformation stable est observée. La structure la plus proche de la structure

moyenne de cette conformation a donc été sélectionnée comme représentative pour les superpositions *in silico*.

Lorsque l'inhibiteur et le DAG sont superposés ([Matériel et Méthodes](#)) en ne considérant que les parties entre accolades des [Figures 49 et 51](#), particulièrement pour le DAG, car les longues chaînes carbonées sont très flexibles pendant la dynamique, une meilleure correspondance est observée entre l'inhibiteur et la conformation 1 du DAG ([Figure 52](#)).

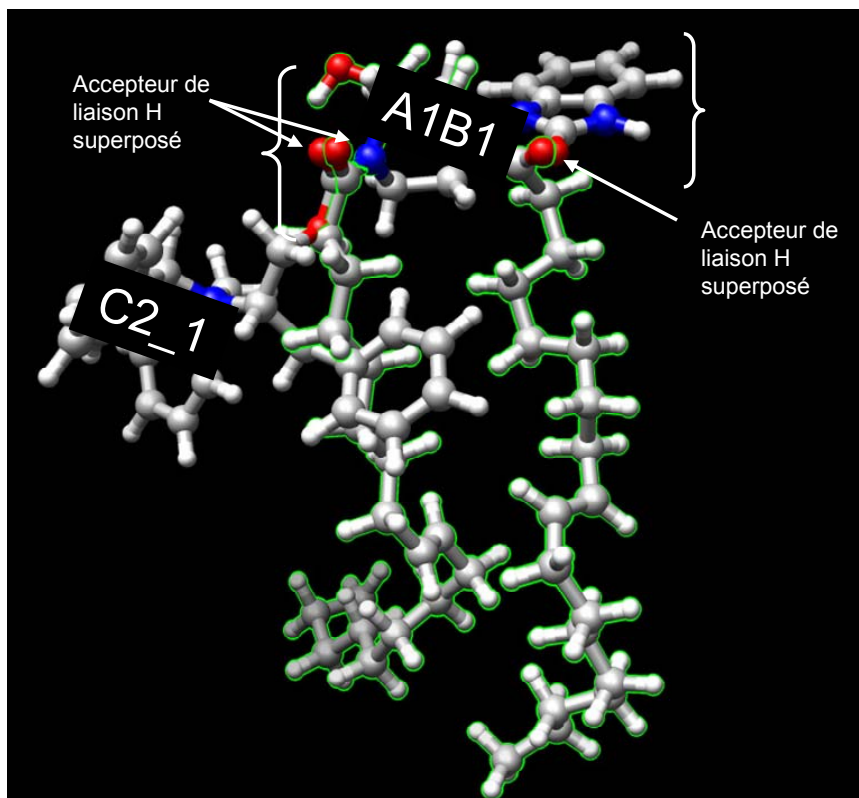


Figure 52 : Superposition de la conformation stable de la molécule A1B1C2_1 avec la conformation 1 du DAG. La structure du DAG est surlignée en vert. La structure peut être visualisée en accord préalable avec E. Maréchal, IRTSV PCV

La [Figure 52](#) montre que deux oxygènes de la partie A1B1 de l'inhibiteur peuvent coïncider avec des oxygènes du DAG, en particulier :

- un oxygène lié à un carbone par une double liaison (groupe carbonyl) de la partie benzoimidazolone est superposable avec l'oxygène du groupe carbonyl de la liaison acyl-ester en position sn-1 du glycérol ;
- un oxygène d'un groupe carbonyl de la fonction carbamate est par ailleurs superposable avec l'oxygène du groupe carbonyl de l'autre liaison acyl-ester, en position sn-2 du glycérol ;
- aucune superposition n'est observée avec l'hydroxyl libre en position sn-3 du DAG, zone de la molécule sur laquelle la catalyse enzymatique se déroule.

Dans la partie hydrophobe du DAG, un noyau benzène est superposable avec des carbones vers les positions C4-C7 des deux acyls, en particulier l'acyl en position sn-2 du glycérol. Toutefois

cette région de la molécule, très mobile, est probablement en dehors du site de liaison, baignant dans le cœur de la membrane.

Cette étude suggère que la compétition a lieu dans la zone de liaison du DAG, mais, de par l'absence de superposition au niveau de l'hydroxyl en position *sn*-3 du glycérol, pas nécessairement dans la zone où se déroule la catalyse enzymatique. L'effet des composés étudiés dans cette thèse peut donc être un effet antagoniste du DAG sur la MGDG synthase, et il n'est donc pas exclu que d'autres protéines liant le DAG soient également sensibles.

Par ailleurs, il est à noter que la zone de liaison du DAG est aussi celle du N-éthylmaleimide (NEM), un réactif des groupements sulfhydryls (agent pontant des thiols) connu pour ses effets délétères irréversibles sur l'activité des MGDG synthases (Marechal *et al.*, 1995). Il est par conséquent aussi envisageable que les inhibiteurs interagissent avec des groupements sulfhydryls dans la poche de liaison du DAG.

Ces informations sont importantes pour analyser l'effet des molécules étudiées dans ce travail de thèse sur des organismes éloignés des Viridiplantae, chez qui il n'a pas été possible d'identifier de gène homologue des MGDG synthases, et qui sont toutefois sensibles aux inhibiteurs identifiés par criblage sur l'enzyme de plante.

III. Etude de l'activité des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1, sur la prolifération de parasites Apicomplexes et de cellules humaines *in vitro*

A. Effets des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération des stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum in vitro*, en cultures asynchrones

La mesure d'activité antipaludique des composés a été réalisée au cours de ce travail de thèse à l'UMR 5235 selon un protocole basé sur un test de Desjardins (Desjardins *et al.*, 1979) modifié (Ancelin *et al.*, 2003) (Matériel et Méthodes). Ce protocole mesure la viabilité des parasites et repose sur l'incorporation d'hypoxanthine, un précurseur de la synthèse des acides nucléiques. Le précurseur est ajouté après incubation des parasites avec les molécules testées pendant 48h (un cycle parasitaire). L'incorporation de l'hypoxanthine dans les acides nucléiques constitue une mesure de la viabilité des parasites. La mesure permet de déterminer une CI50, ici définie comme la concentration de molécule inhibant de 50% la croissance parasitaire.

La Figure 53 montre que les molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 possèdent ainsi des propriétés antipaludiques. En effet, elles ont toutes deux la capacité d'inhiber la prolifération *in vitro* du parasite Apicomplexe *P. falciparum* et présentent des CI50 de l'ordre du μM . La CI50 en présence de la molécule A1B1C2_1 (1,45 μM) est inférieure à celle en présence du composé A1B1C1_1 (6,12 μM). Une différence dans le même sens avait déjà été observée lors de la mesure de CI50 des deux molécules mesurée dans les conditions de criblage sur l'activité de αMGD1 recombinante (partie I B).

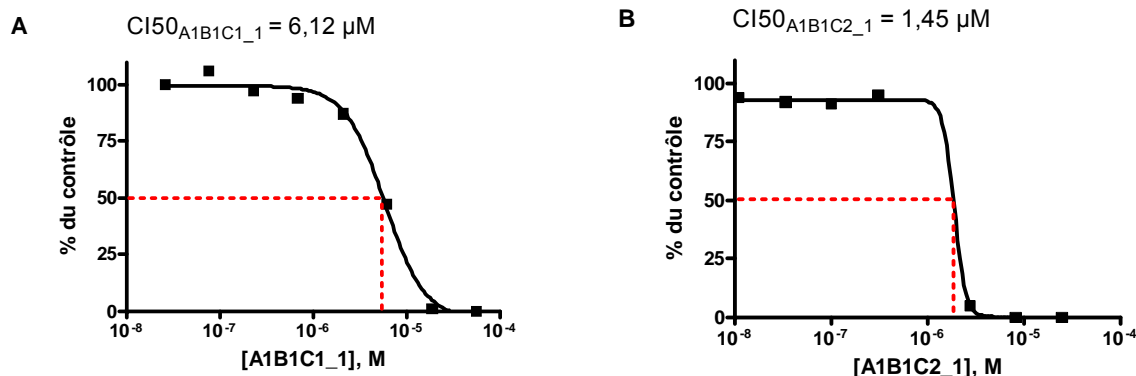


Figure 53 : Mesure de CI50 des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la croissance *in vitro* du parasite *Plasmodium falciparum* (lignée 3D7) par le test de Desjardins. Suivant ce test, A1B1C1_1 présente une CI50 de 6,12 µM et A1B1C2 une CI50 de 1,45 µM.

L'activité antipaludique des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1, basée sur la mesure de leur CI50, a alors été mesurée sur diverses souches plasmodiales (*Plasmodium falciparum* sensibles ou résistants à la chloroquine, la molécule anti-plasmodiale de référence) (Tableau 14).

	CI50 sur <i>Plasmodium falciparum</i> (M)				
	Souches chloroquino-sensibles		Souches chloroquino-résistantes		
	Nigerian	3D7	W2	FCM29	Dd2
A1B1C1_1	2,20e-5	6,12e-6	3,95e-6	1,8e-6	7,65e-6
A1B1C2_1	1,20e-5	1,45e-6	1,05e-6	4,5e-7	1,355e-6
Chloroquine	3,2e-8	1,03e-8	9,9e-8	1,18e-7	1,72e-7
Artémisinine	nd	2,87e-8	nd	nd	6,3e-8
Artésunate	nd	9,70e-9	nd	nd	1,16e-8
Triclosan	nd	1,55e-6	nd	nd	2,1e-6
Glyphosate	nd	>>2,5e-5	nd	nd	>>2,5e-5

Tableau 14 : Mesure de CI50 des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la croissance *in vitro* de diverses lignées du parasite *Plasmodium falciparum* et comparaison avec d'autres molécules. Les mesures ont été réalisées sur lignées sensibles (Nigerian, 3D7) ou résistantes (W2, FCM29, Dd2) à la chloroquine. Des mesures ont aussi été réalisées avec des molécules thérapeutiques courantes (chloroquine, artémisinine, artésunate), un herbicide inhibiteur, chez *Plasmodium falciparum*, de la voie apicoplastique de biosynthèse des acides gras par le système FASII (triclosan), un herbicide inhibiteur, chez *Plasmodium falciparum*, de la voie apicoplastique de biosynthèse des isoprénoides (fosmidomycine), un herbicide (glyphosate) (nd : non déterminé).

Le Tableau 14 montre que le traitement *in vitro* de l'ensemble des souches de parasites *P. falciparum* en présence de molécules induit une diminution drastique de la prolifération cellulaire, décelée par une diminution d'incorporation d'hypoxanthine tritiée lors de la synthèse des acides nucléiques par les parasites. L'inhibition de la croissance *in vitro* du parasite *Plasmodium falciparum* par les molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 est très similaire pour toutes les souches de *P. falciparum*. En effet,

L'inhibition est par ailleurs indépendante de la sensibilité (Nigerian et 3D7) / résistance (W2, FCM-29 et Dd2) de la lignée parasitaire à la chloroquine. Les deux composés conservent une activité

antipaludique sur souches multidrogues-résistantes (l'activité antipaludique mesurée avec A1B1C2_1 est même supérieure à celle mesurée sur souches chloroquino-sensibles).

Des expériences similaires ont été conduites avec des molécules dont les activités antipaludiques sont déjà bien caractérisées (chloroquine, artémisinine, artésunate, triclosan) ainsi qu'un herbicide classique (glyphosate). Les CI50 observées pour A1B1C2_1 sont comparables avec celles du triclosan, un anti-parasitaire connu pour cibler la voie de biosynthèse des acides gras par le système FAS II dans l'apicoplaste.

B. Effets des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération de *Plasmodium falciparum* *in vitro*, en fonction des stades érythrocytaires

Nous avons déterminé la sensibilité de chacun des stades de développement du parasite aux composés. Pour cela une double-synchronisation a été effectuée sur cultures mixtes de globules rouges infectés par des parasites *P. falciparum* de lignée 3D7 afin d'obtenir une plage de synchronisation la plus étroite possible (voir définition dans le [Matériel et Méthodes](#)). Les globules rouges infectés ont été mis en contact 4 heures avec la molécule (A1B1C1_1 ou A1B1C2_1) à chacun des stades anneaux, trophozoïtes puis schizontes, par le test de Desjardins modifié pendant 4h ([Matériel et Méthodes](#)). L'activité antipaludique a été estimée de la même façon que pour les CI50 sur cultures mixtes en mesurant la viabilité des parasites par incorporation d'hypoxanthine tritiée, précurseur de la biosynthèse des acides nucléiques ([Tableau 15](#)).

	CI50 sur <i>P. falciparum</i> 3D7 (M)	
	A1B1C1_1	A1B1C2_1
Anneaux	4,11e-006	4,03e-006
Trophozoïtes	2,82e-006	4,91e-006
Schizontes	1,02e-005	3,48e-006

Tableau 15 : Mesures de CI50 des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 (4h de temps de contact) sur la croissance *in vitro* de cultures synchrones de *Plasmodium falciparum* (lignée 3D7) en fonction du stade parasitaire traité.

Les molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sont actives sur chacun des trois stades érythrocytaires asexués du cycle parasitaire de *P. falciparum* (anneau, trophozoïte et schizonte). On observe une plus grande efficacité de la molécule A1B1C1_1, c'est-à-dire une plus faible CI50 (2,82 μ M), sur les stades trophozoïtes par rapport aux stades anneaux et schizontes (respectivement 4,11 et 10,2 μ M). La molécule A1B1C2_1 paraît plus active sur les stades schizontes et agit de façon plus homogène sur les différents stades (CI50 de l'ordre de 4 μ M). La plupart des composés exercent une activité préférentielle sur un des stades parasitaires, qui correspond à la période du cycle parasitaire où la cible est exprimée, et/ou la période du cycle où la cible est requise pour la survie parasitaire. L'excellente activité des composés A1B1C1_1 et A1B1C2_1 contre chacun des stades érythrocytaires du parasite est un facteur important pour envisager une approche pharmacologique. En effet, chacun des stades parasitaires est sensible aux composés effecteurs, constituant un avantage au regard des

propriétés pharmacocinétiques du composé *in vivo*. Les raisons de cette excellente activité restent à clarifier.

C. Effets des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération de lignées cellulaires humaines *in vitro*

Au-delà de la seule capacité à inhiber la croissance du parasite *in vitro*, l'efficacité d'une molécule doit être évaluée pour sa spécificité en mesurant sa toxicité sur des lignées de cellules mammifères, par exemple une lignée cellulaire de l'hôte ou proche de l'hôte.

L'activité antipaludique des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 a donc été testée sur quatre souches de cellules d'origine humaine: lignée lymphocytaire (lymphoblastes) Jurkat, lignée érythroblastique (K-562) et lignées monocyte-macrophage (THP-1 et U-937). L'activité cytotoxique est mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans les acides nucléiques pendant une période proche du cycle de ces cellules (Tableau 16). Le choix de ces lignées cellulaires s'est porté sur la durée de leur cycle (environ 24 h) afin d'adapter le test de manière uniforme ainsi que l'origine tissulaire des cellules. Les érythroblastes étant les précurseurs médullaires des réticulocytes, il est possible qu'une mesure de la cytotoxicité des molécules sur ces cellules reflète certains phénomènes de toxicité sur les globules rouges, ou leurs précurseurs au niveau de la moelle osseuse.

	CI50 sur cellules humaines (M)			
	Jurkat	K-562	THP-1	U-937
A1B1C1_1	2,33e-5	2,71e-5	1,04e-5	1,51e-5
A1B1C2_1	1,74e-4	1,99e-5	1,48e-5	2,62e-4
Chloroquine	nd	1,1e-5	nd	nd
Artémisinine	nd	≈1e-4	nd	nd
Artésunate	nd	1,06e-6	nd	nd
Triclosan	nd	1,34e-5	nd	nd
Glyphosate	nd	>8,3e-4	nd	nd

Tableau 16 : Mesure de CI50 des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la croissance *in vitro* de diverses lignées de cellules humaines par un test dérivé de Desjardins et comparaison avec d'autres molécules. Les mesures ont été réalisées sur lignées lymphoblastique (Jurkat), érythroblastique (K-562) et monocyte-macrophage (THP-1 et U-937). Des mesures ont aussi été réalisées avec des molécules thérapeutiques courantes (chloroquine, artémisinine, artésunate), un herbicide inhibiteur, chez *Plasmodium falciparum*, de la voie apicoplastique de biosynthèse des acides gras par le système FASII (triclosan), un herbicide inhibiteur, chez *Plasmodium falciparum*, de la voie apicoplastique de biosynthèse des isoprénoïdes (fosmidomycine), un herbicide (glyphosate) (nd : non déterminé).

La molécule A1B1C1_1 présente une CI50 sur lignées humaines relativement élevée. La molécule A1B1C2_1 apparaît plus sélective dans le sens où elle présente une CI50 sur lignées humaines de l'ordre de 10 fois supérieure aux CI50 observées sur *P. falciparum*, ce qui en fait un point de départ intéressant pour une stratégie de diversification de structures moléculaires d'éventuels analogues. Un index de sélectivité élevé est nécessaire pour un développement en clinique humaine (>10 au minimum, >50 très souhaitable).

Dès lors, le calcul du ratio $\frac{CI50_{mammifère}}{CI50_{Plasmodium}}$ s'avère utile à la détermination de la sélectivité de l'inhibition observée.

	CI50 (M)		Ratio CI50 _{K-562} /CI50 _{3D7}
	3D7	K-562	
A1B1C1_1	6,12e-6	2,71e-5	4,43
A1B1C2_1	1,45e-6	1,99e-5	13,72
Chloroquine	1,03e-8	1,1e-5	1068
Artémisinine	2,87e-8	≈1e-4	3484
Artésunate	9,70e-9	1,06e-6	109
Triclosan	1,55e-6	1,34e-5	8,65
Glyphosate	>>2,5e-5	>8,3e-4	nd

Tableau 17 : Sélectivité des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 vis à vis du parasite Plasmodium falciparum en comparaison avec d'autres molécules.

Le composé A1B1C2_1 apparaît plus sélectif que la molécule A1B1C1_1. La sélectivité peut être améliorée par des CI50 par (i) une diminution de la CI50 apparente mesurée sur le parasite *P. falciparum*, (ii) une augmentation de la CI50 apparente mesurée sur les érythroblastes humains K-562 (ou tout autre modèle de prolifération de lignée mammifère).

D. Effets des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération d'autres modèles de parasites Apicomplexes.

Les composés A1B1C1_1 et A1B1C2_1 ont été testés sur d'autres parasites apicomplexes (*Toxoplasma gondii*, tests réalisés par C. Botté à l'institut Jean Roget, Grenoble; *Babesia divergens*, tests réalisés par M. Maynadier au sein de l'UMR5235, Université Montpellier 2). La [Figure 54](#) montre que les composés sont actifs sur ces modèles parasitaires. A la différence des autres modèles étudiés, dans le cas de *Babesia*, le composé A1B1C1_1 présente une activité supérieure à celle de A1B1C2_1.

L'ensemble de ces données montre l'intérêt des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 comme point de départ pour le développement d'une série de candidats anti-parasitaires herbicides, affectant de façon spécifique une voie de synthèse qui pourrait être d'origine végétale chez les parasites Apicomplexes, absente chez les Mammifères et donc présentant un risque potentiellement réduit de cytotoxicité tant chez l'Humain que chez des animaux infectés.

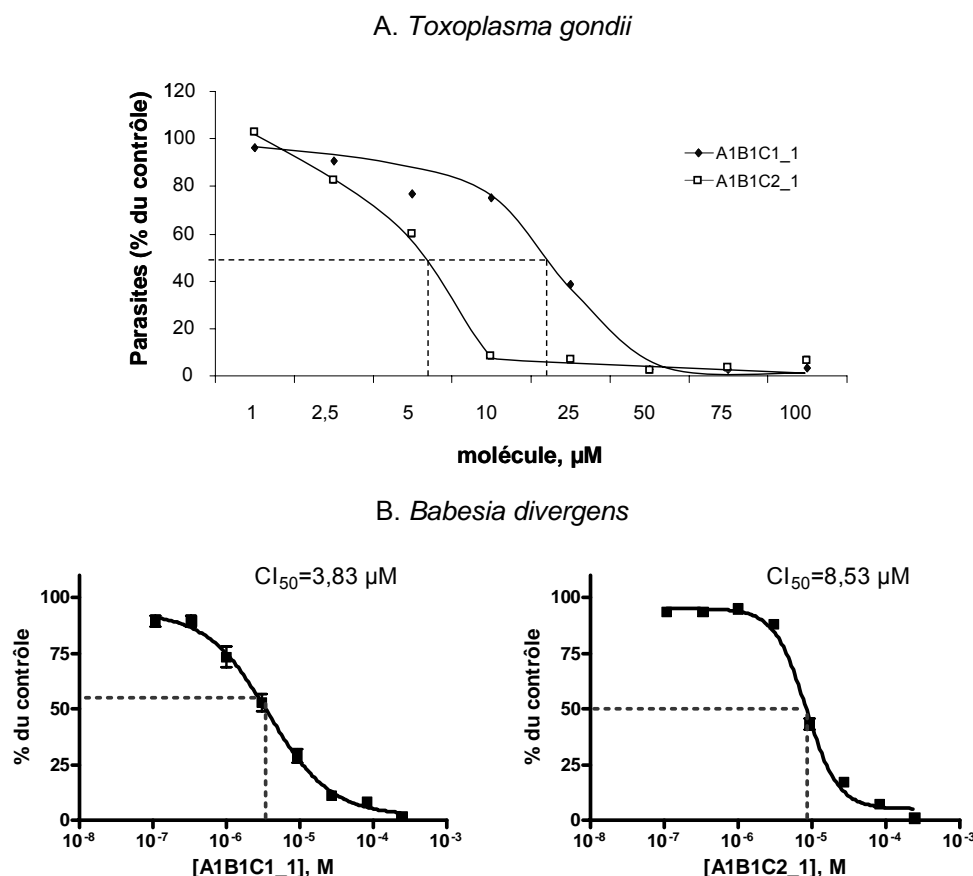


Figure 54 : Mesure de CI₅₀ des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la croissance *in vitro* des parasites *Toxoplasma gondii* (A) et *Babesia divergens* (B). A1B1C1_1 présente une CI₅₀ de 14 µM et A1B1C2 une CI₅₀ de 4,8 µM sur *Toxoplasma gondii*. A1B1C1_1 présente une CI₅₀ de 3,83 µM et A1B1C2 une CI₅₀ de 8,53 µM sur *Babesia divergens*.

IV. Optimisation des molécules en vue d'améliorer les propriétés herbicides et/ou anti-parasitaires, discussion et perspectives

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre, ainsi que des travaux complémentaires réalisés au laboratoire PCV et à l'Institut Jean Roget, Grenoble, montre qu'il est possible de mesurer les effets inhibiteurs des composés A1B1C1_1 et A1B1C2_1 :

- *in vitro*, sur l'activité des MGDG synthèses de plantes, dans un ensemble varié de systèmes (enzymes natives ou recombinantes, en milieu réactionnel constitué de vésicules membranaires ou de micelles mixtes) ; une CI₅₀ correspond à une inhibition de 50% de l'activité contrôle ;
- *in vitro* et *in vivo* sur la croissance de plantes (*Arabidopsis*) et la prolifération d'algues (*Chlamydomonas*) et de parasites (*Plasmodium* -ce travail- ainsi que *Toxoplasma*) ; une CI₅₀ correspond à une inhibition de 50% de la croissance / prolifération par rapport à celle du contrôle.

Il est aussi possible d'établir la concentration à laquelle ces composés deviennent toxiques sur des modèles de prolifération de cellules humaines (une CI₅₀ correspondante peut être mesurée).

A. Optimisation des propriétés herbicides et / ou anti-parasitaires de composés dérivés du châssis moléculaire commun à A1B1C1_1 et A1B1C2_1

Les composés A1B1C1_1 et A1B1C2_1 partagent un même motif moléculaire (ou scaffold) et diffèrent au niveau d'un seul groupement. Un programme d'optimisation de la structure de ces molécules initiales a été initié, dans le but d'améliorer leurs propriétés, en espérant pouvoir faire diverger l'activité anti-parasitaire de l'activité toxique contre les cellules de mammifères. L'augmentation de la sélectivité des composés et un pré-requis indispensable pour envisager un développement en clinique éventuel (Figure 55).

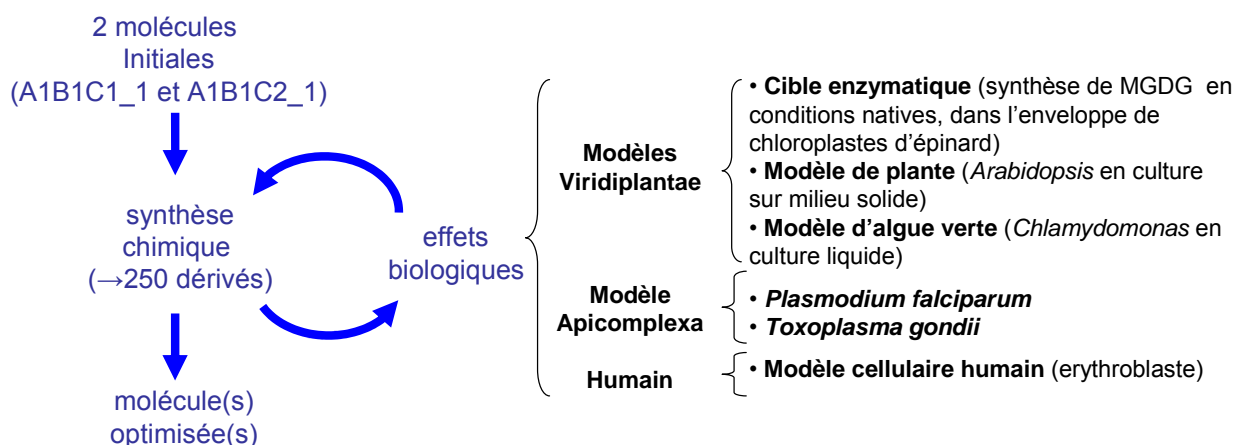


Figure 55 : Stratégie d'optimisation des molécules inhibitrices de la MGDG synthase. Les mesures sur *Plasmodium falciparum* et sur lignée d'érythroblastes humains ont été réalisées dans le cadre de cette thèse ; les mesures sur *Toxoplasma gondii* ont été réalisées par C. Botté (Laboratoire PCV, CEA Grenoble, et Institut J. Roget, Grenoble) ; les mesures sur *Arabidopsis* et *Chlamydomonas* ont en partie été réalisées par Amélie Zoppé (Laboratoire PCV, CEA Grenoble).

De nombreux analogues structuraux des deux molécules initialement étudiées A1B1C1_1 et A1B1C2_1 ont donc été synthétisés par l'équipe de R. Lopez (iBITEC-S ; CEA Saclay). L'analyse *in vitro* des effets d'un total de 250 analogues correspondant à 23 campagnes de synthèse a permis de déterminer leurs CI50 sur divers modèles biologiques (Figure 55).

Les 250 nouvelles molécules ont ainsi été testées pour leurs capacités à inhiber l'activité enzymatique de la MGDG synthase de l'enveloppe d'épinard, la croissance d'une plante (*Arabidopsis thaliana*), la croissance d'une algue verte (*Chlamydomonas reinhardtii*), la croissance de parasites Apicomplexes (*T. gondii* et *P. falciparum*) et la croissance de cellules humaines (érythroblastes).

L'ensemble de tests réalisé a permis pour chaque lot sérié de synthèses (de 10 à 15 composés par campagne), au fur et à mesure de la réalisation des tests d'activité, de déduire les fonctions chimiques importantes à la conservation et si possible à l'amélioration d'une activité spécifiquement herbicide / algicide / anti-parasitaire / antipaludique / antitoxoplasmique en évaluant le gain apporté, ou la perte de bioactivité, suite à un ensemble de modifications de points pharmacophoriques.

Le processus permet donc, par une série de modifications moléculaires et d'essais, de déduire un modèle de QSAR (quantitative structure-activity relationship) afin de rationaliser et

accélérer le processus d'optimisation moléculaire. Une attention particulière a été portée sur le développement de molécules ayant soit un spectre large d'activité, soit un effet spécifique sur les Apicomplexes d'une part et sur les plantes et les organismes photosynthétiques d'autre part. Grâce aux modèles de QSAR déduits des essais résumés dans ce mémoire, deux brevets européens ont été déposés, l'un portant sur l'utilisation de composés ayant une activité inhibitrice de la MGDG synthase en tant qu'herbicide et/ou algicide ([EU 07290683.7](#)) et l'autre, sur l'utilisation de composés aux propriétés anti-parasitaires pour le traitement des maladies infectieuses causées par les Apicomplexes ([EU 07290684.5](#)).

L'ensemble des résultats obtenus au cours des 23 campagnes de synthèse et d'essais biologiques est présenté sous forme de tableau récapitulatif en [Annexe \(Tableau 1\)](#).

Les CI50 des analogues structuraux des deux molécules initialement étudiées ont été mesurées sur souche 3D7 de *Plasmodium falciparum* et érythroblastes de type K-562 en essais standardisés dupliqués. Un gain d'activité notable de l'activité antiplasmodique corrélé à une diminution de la cytotoxicité envers les cellules humaines par rapport à A1B1C2_1 a été observé pour certains composés. En effet, sur les 250 molécules testées sur *Plasmodium falciparum*, 37 présentent une activité anti-parasitaire avec une CI50 inférieure à 1 µM. En ne considérant que l'inhibition de croissance *in vitro* du parasite *Plasmodium falciparum*, la molécule la plus efficace, A51B1C1_1, présente une CI50 de 180 nM, ce qui représente un gain d'activité d'une échelle logarithmique par rapport à A1B1C2_1, et une toxicité sur modèle de prolifération d'érythroblastes à une concentration environ 75 fois supérieure (13,3 µM). Un gain d'activité de l'activité antitoxoplasmique est aussi observé avec cette molécule.

Concernant la sélectivité des molécules, en fonction du ratio CI50 sur cellules humaines vs CI50 sur parasite ([voir plus haut](#)), le composé A21B1C1_1, qui présente une CI50 apparente de 230 nM sur la croissance *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, est la molécule la plus remarquable. En effet, cette molécule est plus de 1000 fois moins toxique envers les cellules K-562 qu'envers le parasite (CI50 apparente de 248 µM sur la croissance *in vitro* d'érythroblastes humains de lignée K-562). Cet indice de sélectivité *in vitro* est du même ordre de grandeur que celui observé pour la chloroquine et l'artésunate ([Tableau 17](#)), molécules classiquement utilisées dans le traitement de paludismes. Ce gain est réservé à *P. falciparum* et n'est pas de la même ampleur pour *T. gondii* ou pour l'inhibition de l'activité de la MGDG synthase (aucune inhibition observée sur la gamme des concentrations en A21B1C1_1 testées).

Nous avons donc réussi à optimiser les effets anti-parasitaires (spécifiquement envers *Plasmodium falciparum* dans le cas de A21B1C1_1) et nous rapprocher des concentrations requises pour un candidat médicament.

De plus, les molécules A1B1C3_2 et A7B1C2_1 présentent des profils intéressants car, tout en ayant conservé la capacité d'inhibition de la prolifération des parasites *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*, elles sont actives sur deux modèles de type végétal, la plante entière *Arabidopsis thaliana* et l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Ces molécules ainsi que d'autres présentant des CI50 peu élevées sur modèle végétal, Apicomplexe et érythrocytaire pourraient aider à tenter une identification d'une ou plusieurs cibles protéiques chez les Apicomplexes de structure potentiellement

analogue de celle des MGDG synthèses de plantes (par « analogie », nous entendons une convergence structurale qui puisse soit dériver de l'existence d'une protéine ancestrale commune, c'est-à-dire d'une « homologie », soit être fortuite).

Pour une visée thérapeutique, les propriétés des molécules identifiées dans cette analyse sur modèles Apicomplexes en font des candidats-médicaments possibles, et peuvent s'inscrire dans un processus de développement de molécules anti-parasitaire (Pink *et al.*, 2005). Pour l'ensemble du programme de développement de composés à potentiels herbicides et / ou anti-parasitaires, les molécules les plus intéressantes ont été sélectionnées et sont à ce jour, en cours de resynthèse à plus grande échelle, afin de les tester sur d'autres modèles de plantes d'intérêt agronomique, et sur modèles animaux d'infection parasitaire.

B. Caractérisation d'une série de composés ayant des propriétés anti-parasitaires intéressantes

1. Choix des composés

Des composés ont été caractérisés plus finement. Il s'agit de composés présentant des CI50 apparentes sur la croissance *in vitro* du parasite *Plasmodium falciparum* inférieures à 1 μ M.

2. Détermination de la CI50 sur 96 heures de cultures mixtes de *Plasmodium falciparum*

La mesure d'activité antipaludique des composés est habituellement réalisée à l'UMR 5235 selon un protocole dérivé du test de Desjardins décrit dans le [Matériel et Méthodes](#). Or, le traitement de cultures *in vitro* de *Plasmodium falciparum* par des composés agissant sur des voies apicoplastiques ne montre pas un effet immédiat mais une mort décalée sur le cycle suivant (Goodman *et al.*, 2007).

Des parasites ont donc été mis en contact avec les composés A1B1C1_1 et A1B1C2_1 (ainsi que diverses molécules de référence dont la chloroquine, ciblant une synthèse voie non apicoplastique, et le triclosan, ciblant la synthèse des acides gras par le système FASII, voie apicoplastique) à diverses concentrations. Après 48 heures et 72 heures, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais, et à 96 heures, de l'hypoxanthine tritiée a été ajoutée et laissée en contact pendant 18 heures. L'incorporation du précurseur radioactif a été mesurée, la CI50 à 96 heures calculée ([Figure 56](#)).

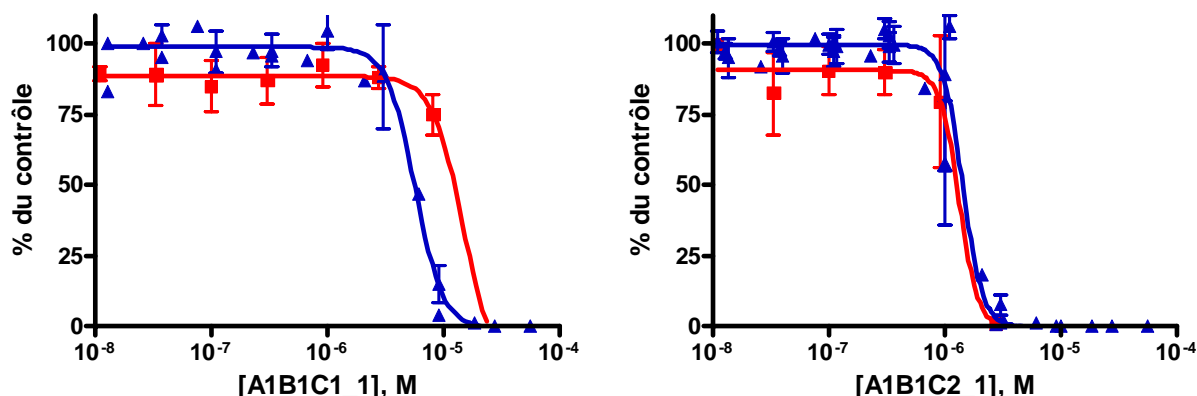


Figure 56 : Comparaison des CI50 des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la croissance *in vitro* de lignée 3D7 de *Plasmodium falciparum* par des tests de Desjardins. Les parasites sont exposés aux composés pendant 48 h. Le test de viabilité s'effectue soit au temps 48 h (bleu), soit au temps 96 h (rouge).

Après comparaison, nous observons une CI50 à 96 heures inférieure à la CI50 à 48 heures pour le triclosan (voie apicoplastique) et une CI50 à 96 heures supérieure à la CI50 à 48 heures pour la chloroquine, A1B1C1_1 et A1B1C2_1. Par conséquent aucun phénomène de mort retardée pour les molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 n'est observé, contrairement aux effets observés lors d'expériences identiques en présence d'antibiotiques ciblant des voies apicoplastiques.

C. Recherche de la cible par utilisation d'un ligand biotinylé

L'équipe de chimie (iBiTec-S CEA Saclay, Groupe de Chimie Combinatoire et Criblage à Haut Débit, R. Lopez, B. Rousseau) a conçu et synthétisé un analogue biotinylé de la molécule A1B1C2_1. Cet analogue nommé A41B1C2_1 possède une activité intéressante contre *Plasmodium falciparum* avec une CI50 de 480 nM. Elle a été utilisée pour construire une colonne d'affinité permettant d'isoler des protéines extraites de *Plasmodium falciparum* susceptibles d'interagir puis d'en identifier des peptides par spectrométrie de masse.

La stratégie de recherche de cibles candidates repose d'une part sur l'affinité du composé A41B1C2_1 pour la cible et d'autre part sur son affinité pour la treptavidine. Un protocole de recherche de protéines cibles des molécules chez le parasite a donc été mis au point. Une extraction séquentielle de protéines solubles puis membranaires natives de *Plasmodium falciparum* a été opérée par trois procédés différents (par lyse hypotonique, solubilisation par le Triton X-100 puis par le Triton X-100 complété de sulfobétaïne NDSB201) ([Matériel et Méthodes](#)).

Cette expérience a nécessité le traitement d'un culot de 4,5 mL de globules rouges infectés à 5,2% de parasitémie ($2,3 \cdot 10^9$ parasites). Un culot équivalent de globules rouges sains a été traité de façon identique afin de réaliser une expérience factice contrôle. Le [Tableau 18](#) montre la quantité de protéines présentes dans chaque fraction.

	Protéines solubles	Protéines extraites par le T X-100	Protéines extraites par le T X-100 /et NDSB201
Globules Rouges	0,707	0,973	0,721
Parasites	1,323	1,043	0,399

Tableau 18 : Quantification des fractions protéiques chromatographiées sur colonne d'affinité. Les résultats sont exprimés en mg.

Chacune des fractions cellulaires a été mise en contact avec une matrice couplée à de la neutravidine et chargée avec le composé A41B1C2_1 suivant la procédure décrite dans le [Matériel et Méthodes](#). Les protéines ayant une affinité pour la molécule biotinylée sont ensuite éluées par ajout de diéthylamine 1M pH 11,5 et analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les bandes protéiques ont ensuite été révélées par coloration au bleu de Coomassie ([Figure 57](#)).

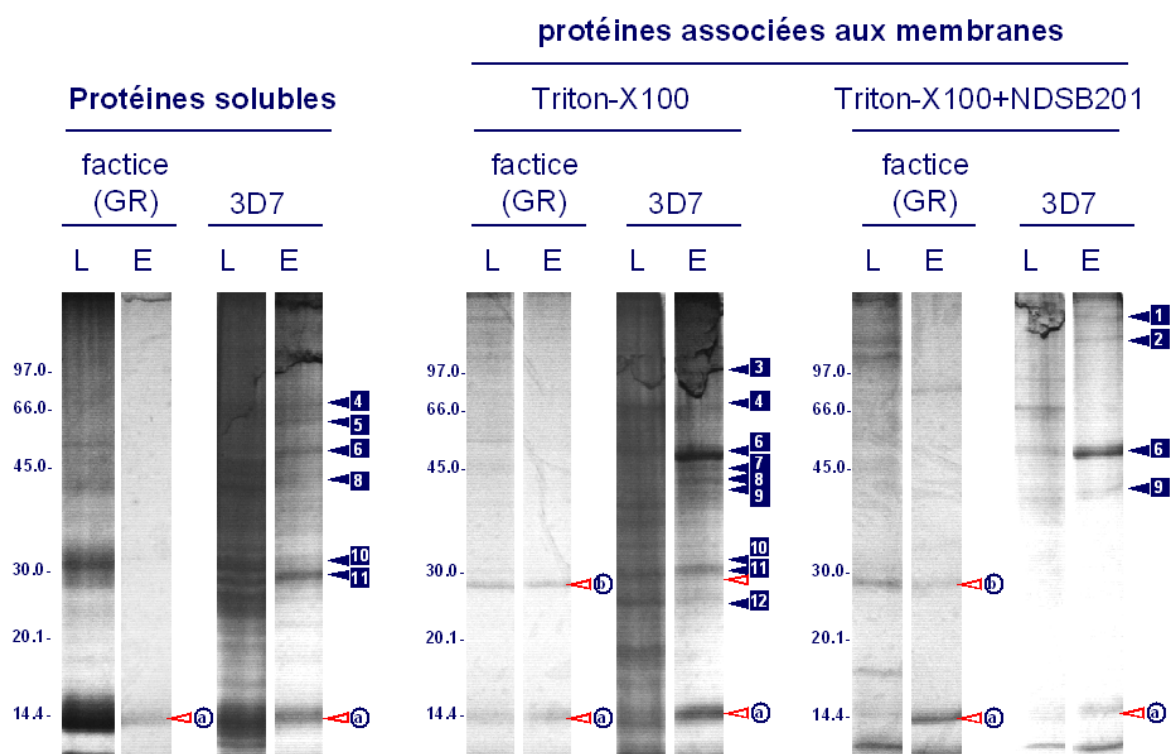


Figure 57 : Analyse électrophorétique des polypeptides purifiés sur colonne d'affinité. Les protéines de chaque fraction ont été séparées sur gel SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie. Les bandes protéiques indiquées par les numéros 1 à 12 (protéines présentes uniquement dans les fractions parasitaires) et les lettres a (protéine présente dans l'ensemble des fractions érythrocytaires et parasitaires) et b (protéine dans l'ensemble des fractions érythrocytaires) ont été excisées puis analysées après digestion trypsique. L, Lavage ; E, Elution à la diéthylamine 1M pH 11,5 ; GR, Globule Rouge.

Les bandes protéiques révélées au bleu de Coomassie ont été excisées et analysées par microséquençage au Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes (EDyP, iRTSV, CEA Grenoble ; dir. J. Garin) ([Matériel et Méthodes](#)). Les morceaux de gel contenant les bandes majeures indiquées sur la [Figure 57](#) ont été découpés, lavés puis incubés en présence de trypsine. Les

peptides tryptiques ont été extraits du gel, dessalés par une microcolonne de phase inverse en système de chromatographie liquide fonctionnant à nano-débit (CapLC, Waters), et nébulisés par ionisation electrospray (ESI) dans un spectromètre de masse de type Quadrupole-TOF (ESI-Q-TOF ; Ultima, Micromass) (voir [Matériel et Méthodes](#)).

La masse des peptides tryptiques permet d'identifier la ou les protéines dont ils peuvent être issus, grâce à la carte peptidique massique (CPM), analogue à une empreinte digitale, des protéines. Les données expérimentales issues du spectromètre de masse ont été analysées à l'aide d'un logiciel de recherche (Mascot, MatrixScience) qui les comparent aux données déduites de chacune des séquences présentes dans la banque de données protéiques interrogée (PlasmoDB ou Trembl pour *Plasmodium falciparum*, après digestion *in silico* de ces protéines par la protéase utilisée, pour générer des CPM ou des spectres de fragmentation théoriques). Il en résulte une liste de toutes les protéines pouvant correspondre aux données expérimentales, classées selon leur score de probabilité, dont l'analyse conduit à l'identification de ou des protéine(s) présente(s) dans l'échantillon analysé. En complément de l'analyse des bandes majoritaires indiquées sur la [Figure 57](#), la piste correspondant aux protéines de *P. falciparum* solubilisées en présence de Triton-X100 et éluées de la matrice d'affinité a été découpée sur toute la longueur en 33 bandes totales, ensuite soumises à trypsination et analyses afin de détecter les protéines mineures également retenues sur la matrice.

Le [Tableau 19](#) présente les protéines majoritaires retrouvées par spectrométrie de masse pour chaque bande protéique excisée. D'autres peptides ont été identifiés avec un score inférieur à ceux présentés dans le [Tableau 19](#) ([Annexes Tableau 2](#)), mais ne correspondent vraisemblablement pas à des peptides des protéines majoritaires présentes dans les bandes excisées.

La [Figure 57](#) montre que des protéines de globule rouge sont également retenues par la colonne de neutravidine couplée à la molécule A41B1C2_1 (polypeptides dont la migration sur gel SDS-PAGE est repérée par les lettres a et b). Ces protéines ont été identifiées après analyse en spectrométrie de masse comme étant une sous unité de l'hémoglobine et de l'avidine ([Tableau 19](#)). La première est un contaminant naturel de toutes les fractions protéiques recueillies lors d'une extraction, tant l'hémoglobine est la protéine majoritaire des globules rouges. Quant à la protéine identifiée comme de l'avidine, il s'agit soit de la streptavidine ajoutée afin de bloquer les protéines naturellement biotinylées, soit de la neutravidine décrochée lors de l'élution de la colonne par ajout de diéthylamine 1M pH 11,5).

Il est étonnant de constater que les protéines identifiées dans la fraction de protéines solubles dans le Triton X-100 et dans la fraction de protéines solubles dans le Triton X-100 complété par les sulfobétaïnes NDSB201 ne sont pas nécessairement des protéines contenant des domaines transmembranaires.

Description	Accession	Organisme	Score	Masse	Couverture	Nombre de peptides trypsin.	Liaison à des nucléotides	Liaison à des lipides	Liaison à des petites molécules tricarbonées	Domaine TM	Compartiment
Polypeptides caractérisés après chromatographie d'extraits protéiques de globules rouges non infectés (mock)											
a Hemoglobin subunit beta - Homo sapiens (Human)	HBB_HUMAN	Human	115,18	15988	17,24	3	-	-	-	-	cytoplasme
b Avidin precursor - Gallus gallus (Chicken)	AVID_CHICK	chicken	268,50	16758	36,84	5	-	-	-	-	issu de la matrice d'affinité
Polypeptides caractérisés après chromatographie d'extraits protéiques de Plasmodium falciparum											
1 Merozoite surface protein 1, - P. falciparum	O810U8_PLAF7_PFI1475w	Plasmodium	872,86	195605	9,96	17	-	?	-	1	Sp ; PM SM
2 High molecular weight rhoptry protein-2 - P. falciparum	O81060_PLAFA_PFI1445w	Plasmodium	862,45	162561	15,64	20	-	?	-	0 / 1	Sp ; Rhop SM
3 Long-chain-fatty-acid-CoA ligase, putative - P. falciparum	O81535_PLAF7_PFI1880w	Plasmodium	517,18	92034	11,84	8	AMP/ ATP	Acyl-CoA	-	0	cytoplasme
4 Heat shock 70 kDa protein - P. falciparum	O81B24_PLAF7_PFI08_0054	Plasmodium	993,86	73868	28,76	15	ATP	-	-	0	Cytoplasme Mito SM
5 Heat shock protein - P. falciparum	O812X4_PLAF7_PFI0875w	Plasmodium	1073,3	72343	32,88	19	ATP	-	-	0	Sp ; RE SM
6 Putative uncharacterized protein - P. falciparum	O81IV8_PLAF7_PFI11_0055	Plasmodium	639,74	49235	29,75	13	NADP?	?	?	0	Sp ; SM apicoplasme RF??
7 Putative pyruvate kinase - P. falciparum	O6LF06_PLAF7_PFI1300w	Plasmodium	997,75	55625	43,96	15	ATP	-	pyruvate	0 / 1	Cytoplasme SM
8 Elongation factor 1-alpha - P. falciparum	O810P6_PLAF7_PFI13_0304	Plasmodium	916,01	48928	45,05	16	GTP	-	-	0	Cytoplasme SM
9 Fructose-bisphosphate aldolase - P. falciparum	ALF_PLAFA_PFI14_0425	Plasmodium	402,88	40080	24,66	7	-	-	glycerone-P + glyceraldehyde 3-P	0	Cytoplasme SM
10 L-lactate dehydrogenase - P. falciparum	LDH_PLAFD_PFI13_0141	Plasmodium	352,08	34086	20,65	6	NAD	-	D-lactate ; pyruvate	0	Sp+Tp ; SM apicoplasme
11 Adenylate kinase 2 - P. falciparum	O7Z0H0_PLAFA_PFI10_0086	Plasmodium	425,39	27594	38,80	8	ATP	-	-	0	Cytoplasme SM
12 Putative Rab7 GTPase - P. falciparum	O9NFG0_PLAFA_PFI0155c	Plasmodium	274,00	23773	26,85	5	GTP/ ATP	-	-	0	Sp ; Noyau ?

Tableau 19 : Analyse par spectrométrie de masse des polypeptides majoritaires détectés après fractionnement d'extraits de globules rouges humains non infectés ou de *Plasmodium falciparum*, par chromatographie d'affinité sur matrice couplée avec un dérivé bioactif biotinyllé. Le tableau liste les polypeptides majeurs fractionnés par chromatographie d'affinité sur matrice couplée avec un dérivé bioactif biotinyllé, identifiés après séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes (voir Figure 57) et analyse par LC-MS/MS suivant la procédure décrite dans le Matériel et Méthodes. La première partie du tableau liste les polypeptides identifiés après chromatographie de globules rouges non infectés (« mock », ou factice sur la Figure 57) et la seconde partie les polypeptides majeurs identifiés après chromatographie d'extraits protéiques de *P. falciparum*. Du fait que les inhibiteurs ont été criblés sur l'activité d'une enzyme transférant un sucre d'un donneur nucléotidique sur un accepteur lipidique, le tableau indique les sites de liaison à des nucléotides et à des lipides comme potentiellement impliqués dans la fixation à la matrice d'affinité. Pour ce qui concerne l'inhibition de la MGDG synthase de plante, les inhibiteurs sont des compétiteurs du diacylglycérol, suivant une superposition avec le squelette glycérol de ce lipide : les sites de liaison à des petites molécules tricarbonées (glycéron-P, glyceraldehyde-3-P, lactate, pyruvate), sont donc indiqués comme des zones potentiellement impliquées dans la liaison à la matrice d'affinité. Mito, mitochondrie ; RE, réticulum endoplasmique ; Rhop, rhoptries ; Sp, peptide signal ; Structures de Maurer.

Parmi les protéines qui interagissent avec la molécule biotinyllée A41B1C2_1, des protéines très abondantes ou retrouvées régulièrement dans des analyses similaires sont identifiées par microséquençage : MSP-1 (Merozoite Surface Protein 1), RhopH2 (High Molecular Weight Rhoptry Protein), les protéines de choc thermique Hsp (Heat shock Protein), LDH (Lactate DéHydrogénase).

MSP-1 (Merozoite Surface Protein 1, accession PlasmoDB PFI1475w), protéine de la famille des adhésines possède une ancre GPI. C'est l'antigène de surface majeur du mérozoïte. Son rôle dans les phénomènes de cytoadhérence tend à l'exclure des cibles potentielles de A41B1C2_1.

RhopH2 (accession PlasmoDB PFI1445w) est une protéine sécrétée depuis les rhoptries vers la vacuole parasitophore (Ghoneim *et al.*, 2007). Elle est par la suite exportée vers le cytoplasme du globule rouge, proche de la membrane plasmique de ce dernier (Vincensini *et al.*, 2008) et contient un motif PEXEL d'export vers la cellule hôte. Elle appartient au complexe RhopH, composé de RhopH1, RhopH2 et RhopH3, et est donc liée à RhopH1 et RhopH3, qui est impliquée dans les phénomènes de cytoadhérence (Ling *et al.*, 2003). Comme pour MSP-1, ces propriétés tendent à l'exclure des cibles potentielles.

L'acyl-CoA ligase spécifique des acides gras à longues chaînes carbonées (accession PlasmoDB PFL1880w) ne semble pas avoir été identifiée dans de précédentes analyses de protéomiques et de microséquençages en spectrométrie de masse. L'analogie entre d'une part le DAG et la molécule A1B1C2_1, molécule à l'origine du composé biotinyllé A41B1C2_1, et d'autre part entre le DAG et l'acyl-CoA en temps que deux acyl-lipides, suggère que cette protéine puisse être une cible potentielle du composé actif.

Les Hsp font partie des protéines chaperonnes. Les deux Hsp (accession PlasmoDB PF08_0054 et PFI0875w) identifiées dans ce travail sont exportées vers les structures de Maurer. Hsp70 (de poids moléculaire 73 kDa) permet l'import de protéines dans la matrice mitochondriale. Impliquée dans le transport de protéines à destinée apicoplastique, une Hsp70 a aussi été rapportée comme capable de fusionner avec la membrane la plus externe de l'apicoplaste (Foth *et al.*, 2003) et il est possible qu'il s'agisse de la même protéine. La seconde Hsp (de poids moléculaire 72 kDa) est mieux connue sous l'appellation BiP. Il s'agit de l'homologue de Hsp70 présente au niveau du réticulum endoplasmique (Pavithra *et al.*, 2007). Elle est particulièrement abondante : les transcrits du gène PFI0875w sont parmi les plus abondants chez les stades érythrocytaires du parasites

Plasmodium falciparum. Les Hsps sont souvent associées à des lipides, au cours de situations de stress en particulier (Arispe *et al.*, 2002). Impliquées dans les transports vésiculaires, elles sont régulièrement retrouvées dans les analyses protéomiques.

PF11_0055 code pour une protéine hypothétique de fonction inconnue, qui possède un domaine thiorédoxine. Cette protéine est conservée chez les Alvéolés, groupe dans lequel sont classés les Apicomplexes (Introduction). Elle partage des homologies de domaines avec les disulfides isomérases, dont des peptides sont identifiés par spectrométrie de masse (Tableau 2 en Annexe). PF11_0055 est décrite comme une enzyme putative des structures de Maurer (Vincensini *et al.*, 2005; Lanzer *et al.*, 2006). Toutefois, selon la Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>), PF11_0055 est référencée comme une protéine de l'apicoplaste, ce qui ne permet pas de conclure avec certitude sur la localisation subcellulaire exacte.

Il est intéressant de noter, d'une part, que la présence d'atomes de soufre dans le squelette chimique des analogues développés à partir de A1B1C1_1 et A1B1C2_1, tend à diminuer la CI50 apparente sur la croissance *in vitro* des parasites Apicomplexes (voir Tableau 1, en annexe). D'autre part, dans le site du DAG des MGDG-synthases, qui est aussi le site de fixation des inhibiteurs, le NEM a la capacité d'établir des liaisons covalentes irréversibles avec des groupements thiols de groupements cystéinyles essentiels pour l'activité enzymatique. Il est donc possible que les inhibiteurs agissent du fait de leur analogie structurale avec le DAG leur permettant d'occuper stériquement le site de liaison de ce lipide, et qu'ils agissent aussi par une interaction avec un ou plusieurs atomes de soufre. La liaison d'un inhibiteur de la chimiothèque avec un domaine thiorédoxine pourrait procéder de ce type d'interaction.

Suivant ce même raisonnement, il est envisageable que l'acyl-CoA ligase PFL1880w discutée plus haut, catalysant une thioestérification des acyls à longue chaînes sur le Coenzyme A, soit aussi invalidée fonctionnellement par interaction avec les groupements thiols essentiels à la réaction de thioestérification.

Le facteur d'élongation 1 alpha (accession PlasmoDB PF13_0304) est une protéine impliquée dans le processus de synthèse des protéines. Ce type de protéines est un contaminant classique des études protéomiques du fait de leur grande abondance (excepté lors des analyses après séparation sur gel en 2 dimensions, du fait de leur pH isoélectrique basique) (Le Roch *et al.*, 2003).

La fructose biphosphate aldolase (accession PlasmoDB PF14_0425) établit un pont entre la partie cytoplasmique de TRAP (Thrombospondin Related Anonymous Protein, accession PlasmoDB, PF13_0201) et l'actine du moteur acto-myosine situé au niveau du complexe interne membranaire chez la forme sporozoïte du parasite (Bosch *et al.*, 2007). Confirmant cette hypothèse, elle a été identifiée d'une part lors d'une analyse en spectrométrie de masse des protéines présentant une affinité à l'actine (Schmitz *et al.*, 2005), d'autre part comme une enzyme putative des structures de Maurer (Vincensini *et al.*, 2005; Lanzer *et al.*, 2006). La fructose biphosphate aldolase PF14_0425 ne possède pas de séquence compatible avec l'existence de domaines transmembranaires, bien qu'elle soit retrouvée dans les échantillons protéiques extraits par le Triton X-100 et par le Triton X-100 additionné de sulfobétaïnes. Un homologue de la fructose biphosphate aldolase chez *Arabidopsis* semble par ailleurs interagir avec Hsp70, et il serait donc envisageable que plusieurs protéines éluées

de la matrice d'affinité, soient de fait parties d'un complexe associé aux structures de Maurer dont la liaison à la matrice n'impliquerait qu'un de ses constituants.

La lactate déshydrogénase (LDH, accession PlasmoDB PF13_0141), protéine très abondante du parasite, enzyme de la glycolyse, avait été identifiée, lors d'expériences de photoaffinité, comme cible de la chloroquine (Foley *et al.*, 1994), hypothèse infirmée par la suite (Menting *et al.*, 1997). Par conséquent la présence de cette protéine dans cette analyse ne signifie pas nécessairement qu'elle interagisse avec la molécule immobilisée sur la colonne d'affinité de façon spécifique. En général, les enzymes de la glycolyse sont très abondantes chez *P. falciparum*. Ainsi l'analyse du transcriptome de *P. falciparum* révèle une abondance 10 fois supérieure à celle des transcrits d'Hsp70 et 100 fois supérieure à celle de l'actine (Le Roch *et al.*, 2003). Cette protéine possède elle aussi un motif PEXEL prédit d'export vers la cellule hôte.

La pyruvate kinase (accession PlasmoDB PFF1300w) est elle aussi une molécule impliquée dans le processus de glycolyse. Cette protéine a été identifiée en spectrométrie de masse comme interagissant avec les molécules d'actine (Schmitz *et al.*, 2005) ainsi que comme protéine des structures de Maurer (Vincensini *et al.*, 2005), une localisation soutenue par la présence d'un domaine d'export vers la cellule hôte (motif PEXEL).

L'adénylate kinase 2 (accession PlasmoDB PF10_0086) est impliquée dans le catabolisme de l'ATP par synthèse d'ADP.

La GTPase putative Rab7 (accession PlasmoDB PFI0155c) est une protéine surexprimée chez les stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*. Elle est impliquée dans la régulation de la taille de la vacuole (Quevillon *et al.*, 2003). Le taux de produits de transcription de son gène codant est particulièrement important (Isokpehi and Hide, 2003). On peut supposer que cette abondance est responsable de sa présence parmi les protéines identifiées au cours de ce travail (Tableau 2, en Annexe). De nombreux peptides retrouvés suite à cette étude sont de plus compatibles avec les protéines de la superfamille AlbA (acétylée au niveau d'un résidu Lysine), déacétylée par Sir2 (Tableau 2 en Annexes).

En premier lieu, il est étonnant de constater que parmi les 12 protéines majoritaires présentées dans le Tableau 19, 10 (PFI1475w, PFI1445w, PF08_0054, PFI0875w, PF11_0055, PFF1300w, PF13_0304, PF14_0425, PF13_0141, PF10_0086) ont été identifiées dans des analyses précédentes réalisées par spectrométrie de masse en tandem visant à caractériser les protéines des structures de Maurer (Vincensini *et al.*, 2005; Lanzer *et al.*, 2006). Ces protéines apparaissent sur le tableau avec l'indication compartimentale SM. Si certaines de ces protéines peuvent d'emblée être écartées comme cibles potentielles des molécules dont fait l'objet ce travail, d'autres présentent un profil intéressant, compatible avec les caractéristiques structurales ou le mode d'action supposé des molécules.

Il est aussi à noter que les protéines analysées comme possédant une affinité pour l'actine, molécule associée au complexe membranaire interne de *Plasmodium falciparum*, sont toutes identifiées dans notre travail (Schmitz *et al.*, 2005). Quatre des protéines majoritaires décrites dans le Tableau 19 sont présentes dans le travail sus-cité : PF08_0054, PFF1300w, PF13_0304, PF14_0425.

Suite à cette analyse préliminaire des protéines retenues sur matrice d'affinité couplée à la neutravidine et à un dérivé bioactif biotinylé, il apparaît d'une part qu'aucun polypeptide majeur ne semble lié à une fonction de synthèse de glycolipides. Il est possible qu'une telle enzyme de synthèse soit mineure et corresponde à un des polypeptides de fonction inconnue, identifiés par microséquençage, parmi lesquelles certaines séquences présentent des peptides d'adressages apicoplastiques. L'expression en système bactérien de protéines recombinantes, notamment PFL1880w et PF11_0055 parmi les polypeptides majeurs, et certains des polypeptides mineurs identifiés par microséquençage, afin d'étudier la spécificité de liaison des inhibiteurs, et de déterminer les paramètres cinétiques d'une inhibition éventuelle de leur activité s'avère une perspective importante.

Conclusion

Chez les plantes, les galactoglycérolipides (*i.e.* MGDG ou monogalactosyldiacylglycérol et DGDG ou digalactosyldiacylglycérol) sont des lipides essentiels à la biogenèse des membranes de tous les types de plastes étudiés à ce jour. Ils sont particulièrement abondants dans les chloroplastes, et peuvent constituer jusqu'à 80% des lipides de l'enveloppe limitant ces organites. Dans certaines conditions physiologiques telles que la carence de phosphate, le DGDG peut de plus être exporté vers d'autres compartiments membranaires où ils se substituent aux phospholipides. Les réactions de synthèses de ces galactolipides ont lieu dans les membranes de l'enveloppe des plastes par transfert d'un galactose d'un donneur UDP-galactose sur un accepteur DAG constituant le MGDG, lui-même substrat pour une seconde galactosylation générant le DGDG. La première réaction est catalysée par une galactosyltransférase appelée MGDG synthase de la famille GT28 selon la classification CAZy des glycosyltransférases. La seconde réaction est catalysée par une DGDG synthase de la famille GT4.

Plasmodium falciparum est un organisme eucaryote unicellulaire qui appartient au phylum des Apicomplexes. Il possède aussi un plaste, non photosynthétique, appelé apicoplaste, acquis par endosymbiose secondaire. L'apicoplaste est un organite semi-autonome au même titre que la mitochondrie, et contient un génome circulaire de 35 kb. Son intégrité est essentielle à la survie du parasite. Cette origine endosymbiotique en fait le siège de voies métaboliques propres aux procaryotes et/ou aux végétaux. Ces voies absentes des cellules de l'organisme humain constituent des cibles potentielles pour le développement de thérapeutiques antiplasmodiales à caractère antibiotique ou herbicide.

Le marquage métabolique de membranes de parasites *Plasmodium falciparum* par incorporation d'UDP-galactose radioactif avait révélé l'existence de lipides aux propriétés chromatographiques similaires à celles de galactolipides chloroplastiques MGDG et DGDG. Dès lors l'existence chez *Plasmodium falciparum* d'une voie de biosynthèse de galactolipides proches en structure de celle des galactolipides chloroplastiques a été supposée, sans toutefois qu'un gène correspondant puisse être identifié.

Les objectifs de ma thèse visaient à explorer la validité de l'hypothèse de la présence d'une voie de synthèse de galactolipides chez *Plasmodium falciparum* et d'en évaluer les potentialités en tant que cible pour le développement de molécules thérapeutiques innovantes à activité herbicides et anti-parasitaires potentielles.

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord montré que des anticorps produits par immunisation de lapins ou d'un rat avec du DGDG réagissent avec un épitope de structure vraisemblablement proche des digalactolipides (diagalactolipide like epitope ou DGLE) qui s'avère présent chez l'ensemble des stades érythrocytaires asexués et sexués (gamétocytes) du parasite *Plasmodium falciparum*, chez les sporozoïtes de *Plasmodium berghei* ainsi que chez d'autres Apicomplexes (*Babesia divergens*, *Toxoplasma gondii*). Cet épitope apparaît sous forme ponctuée et

apposée aux membranes au niveau de structures encore indéfinies. Ces travaux ont permis de décrire un modèle d'évolution de la répartition du DGLE au cours du stade érythrocytaire du parasite et sont cohérentes avec une distribution dans certaines membranes, dont le complexe membranaire interne. Nos tentatives de caractériser la structure du DGLE à partir d'extraits lipidiques de *T. gondii* (modèle permettant d'obtenir plus de matériel biologique), par spectrométrie de masse (en collaboration avec R. Welti de l'Université du Kansas), n'ont malheureusement pas permis d'apporter de données concluantes. Il est possible que le DGLE corresponde à du DGDG, ou bien qu'il s'agisse d'un glycolipide dont la tête polaire est proche du digalactosyl en position *sn*-3 du glycérol. Il n'est pas exclu qu'il existe aussi plusieurs lipides réagissant avec les anticorps anti-DGDG. Nous avons de plus construit un système d'expression fonctionnelle d'une MGDG synthase de plante, permettant de synthétiser en abondance d'une part le MGDG, et d'autre part un digalactolipide nécessairement accumulé par une activité glycosyltransférase parasitaire. Il reste à déterminer si cette activité glycosyltransférase produisant du DGDG, mise en évidence chez les parasites transformés, coïncide avec l'activité de synthèse du DGLE.

Dans une seconde partie, nous avons caractérisé l'effet de molécules sélectionnées pour leur capacité à inhiber la synthèse de galactolipides de plantes sur la prolifération *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Jusqu'aux travaux présentés dans ce mémoire, aucun inhibiteur spécifique de la synthèse des galactolipides chloroplastiques n'était connu. Un procédé parallélisé et statistiquement robuste d'évaluation de l'inhibition de l'activité MGDG synthase de plante a été développé et miniaturisé afin d'être adapté à un criblage robotisé. Le criblage d'une chimiothèque de 24000 composés (appartenant à la société CEREP) a permis d'identifier deux molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 (qui ne diffèrent l'une de l'autre que par la présence d'un groupement benzyle) aux propriétés inhibitrices sur la forme recombinante de MGDG synthase 1 d'*A. thaliana*. Ces deux molécules présentent un effet inhibiteur sur l'ensemble de la famille multigénique de MGDG synthases d'*Arabidopsis thaliana* et sur la MGDG synthase 1 d'épinard (recombinante ou sous forme native dans l'enveloppe chloroplastique). Des propriétés herbicides sur plante entière dues à l'inhibition de la synthèse des galactolipides ont été mesurées pour les inhibiteurs A1B1C1_1 et A1B1C2_1, de même que des propriétés algicides sur *Chlamydomonas reinhardtii*. Aucun effet sur les modèles bactériens *Escherichia coli* et *Mycobacterium bovis* n'a pu être mesuré, indiquant que ces molécules n'inhibent pas MURG, glycosyltransférase bactérienne de structure proche des MGDG synthases.

Afin d'étudier le mode d'action des composés sur les MGDG synthases, la cinétique enzymatique des enzymes recombinantes *at*MGD1 et *so*MGD1 a été suivie en présence d'A1B1C2_1, le composé présentant la meilleure activité sur l'ensemble des modèles étudiés. Cette analyse enzymologique révèle une inhibition compétitive de A1B1C2_1 vis à vis du diacylglycérol et une inhibition mixte non compétitive / anticompetitive vis à vis de l'UDP-galactose. Ces résultats montrent que le composé A1B1C2_1 agit comme analogue du diacylglycérol.

Nous avons mesuré la bioactivité des molécules A1B1C1_1 et A1B1C2_1 sur la prolifération *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, et mesuré un effet anti-parasitaire avec une CI50 de l'ordre du micromolaire. L'activité des composés sur la prolifération *in vitro* d'érythroblastes humains de type K-

562 a démontré des index de sélectivité de 5 à 15 de ces molécules, en tout cas à améliorer en vue d'un développement de candidat médicament.

Dès lors un processus d'optimisation des composés a été entrepris afin d'augmenter l'activité sur parasites et diminuer l'activité sur érythroblastes humains. Plus globalement, ce programme d'optimisation est le résultat d'un travail de collaboration entre le Groupe de Chimie Combinatoire et Criblage à Haut Débit (équipe de Roman Lopez et Bernard Rousseau ; iBiTec-S, CEA Saclay), le Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale (équipe d'Eric Maréchal ; iRTSV, CEA Grenoble), le Laboratoire Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques (équipe de Catherine Braun-Breton, Jean-François Dubremetz et Henri Vial, Université Montpellier 2), et le Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes (équipe de Corinne Mercier et Marie-France Cesbron-Delauw ; Institut Jean Roget, Grenoble) visant à identifier des molécules anti-parasitaires et / ou herbicides. Une diversification de la structure chimique des molécules a donc été réalisée par une série de campagnes (série de synthèses chimiques). Lors de chaque campagne des analogues des molécules initiales ont été synthétisés et des tests biologiques ont été conduits sur la prolifération de *Plasmodium falciparum* 3D7 et d'érythroblastes humains K-562. Ces tests ont permis d'affiner le sens d'optimisation des composés. Finalement, 23 campagnes de synthèses (pour un total de 250 composés) suivies de tests biologiques ont été réalisées, et ont pour résultat la production de molécules avec un gain substantiel

- d'activité anti-parasitaire (d'une échelle logarithmique, l'activité antipaludique la plus efficace étant de 180 nM)
- de sélectivité (multipliée par plus de 100, l'index de sélectivité le plus important étant de 1000).

En intégrant l'ensemble des résultats obtenus sur plusieurs modèles biologiques (activité enzymatique MGDG synthase d'enveloppe chloroplastique d'épinard, croissance d'*Arabidopsis thaliana* et de *Chlamidomonas reinhardtii*, prolifération in vitro de *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, et d'érythroblastes humains), nous observons différents profils d'optimisation en fonction des choix opérés lors des synthèses de composés :

- une optimisation dans le sens de l'amélioration d'une inhibition à large spectre (sur tous modèles biologiques hormis sur érythroblastes humains)
- une optimisation dans le sens de l'amélioration de l'effet inhibiteur sur la prolifération d'Apicomplexes
- une optimisation dans le sens de l'amélioration de l'effet inhibiteur sur la prolifération d'organismes photosynthétiques

Bien que les molécules initialement sélectionnées par criblage pour leur capacité à inhiber une activité MGDG synthase soient des inhibiteurs évidents de la prolifération in vitro de *Plasmodium falciparum*, jusqu'à aujourd'hui et en dépit d'une recherche *in silico* importante, aucune MGDG synthase n'a pu être identifiée chez le parasite. Au cours des campagnes de synthèses d'analogues, le composé de châssis moléculaire A1B1C2_1 a été biotinylé. La molécule présente une activité antipaludique de 500 nM et anti-toxoplasmique de 2,5 μ M. Afin d'identifier la (les) protéine(s) parasite(s) cible(s), et de mieux comprendre les voies métaboliques ou les processus biologiques

invalidés par les molécules identifiées, des protéines de *Plasmodium falciparum* ont été extraites de façon séquentielle en fonction de leur solubilité dans des détergents, et ont été chargées sur une matrice couplée à la neutravidine sur laquelle était immobilisée la molécule biotinylée. Les protéines sélectionnées par affinité ont été séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes et analysées par spectrométrie de masse après digestion trypsique. Parmi les protéines majeures identifiées, une protéine hypothétique (PF11_0055) ainsi qu'une acyl-CoA ligase (PFL1880w) sont des candidats intéressants dont l'interaction avec les inhibiteurs devra être approfondie dans l'avenir. D'une part PF11_0055 est, selon la Gene Ontology, référencée comme une protéine de l'apicoplaste. De plus elle possède un domaine thioredoxine (Trx), domaine qui a pour fonction principale la formation et le réarrangement de ponts disulfures, ainsi que la réduction de fonctions thiols. Or l'intégrité des fonctions thiols semble nécessaire à l'activité MGDG synthase ; les inhibiteurs pourraient agir de façon semblable sur P11_0055 et sur les MGDG synthases en interagissant avec les fonctions thiols importantes pour ces deux protéines, dans le site thioredoxine et le site de liaison du DAG respectivement. D'autre part PFL1880w, catalysant la thioestérification d'acyls à longue chaînes sur le Coenzyme A, pourrait être une cible du fait de l'analogie structurale de la série d'inhibiteurs avec le DAG et présentant peut être une ressemblance stérique avec l'acyl-CoA, et / ou être invalidée fonctionnellement par interaction avec les groupements thiols essentiels à la réaction de thioestérification.

Les travaux présentés dans ce mémoire avaient comme objectif une étude exploratoire de la synthèse possible de galactolipides chloroplastiques chez les Apicomplexes. Les données que nous avons accumulées n'ont pas permis de valider ou d'invalider cette hypothèse, et de nombreuses questions restent non résolues. Concernant tout d'abord la détection de galactoglycérolipides chez les Apicomplexes, il est important de caractériser la structure exacte du DGLE et sa localisation précise. Chez le parasite *Plasmodium falciparum*, il apparaît ici une limite dans les méthodologies disponibles. L'amélioration des conditions de fixation et de coupe des échantillons biologiques devrait être poursuivie afin de localiser l'épitope finement par microscopie électronique (notamment par marquage avant inclusion en utilisant des particules d'or de taille très réduite). Un effort pourrait être conduit sur les expériences de co-marquage. Il serait intéressant d'étudier la répartition du DGLE en conditions de stress ou induit par des molécules thérapeutiques. Il devrait être possible notamment de déterminer lequel des lipides séparés par chromatographie est susceptible de réagir avec le DGLE par technique de lipid-overlay. La caractérisation structurale nécessite une production de matériel biologique en masse, et vraisemblablement une étape de fractionnement subcellulaire des compartiments membranaires, qui permette l'extraction de quantités suffisantes de lipides pour des analyses par spectrométrie de masse.

Cette étude présente par ailleurs un programme original de recherche et de développement de nouvelles classes de molécules ayant des propriétés intéressantes en tant que candidats herbicides et candidats médicaments anti-parasitaires. Le programme complet est nécessairement pluridisciplinaire, impliquant des chimistes et des biologistes spécialisés dans des domaines de recherche très différents. Les suites à donner à ce travail dans une visée thérapeutique sont

importantes, car le développement de candidats médicaments est un processus long selon le schéma classique depuis la validation d'une cible jusqu'aux essais cliniques. Dans la continuité directe de ce travail, il sera notamment nécessaire de caractériser biochimiquement l'interaction entre les composés inhibiteurs et les cibles potentielles identifiées par l'étude protéomique présentée dans ce mémoire. De nouvelles campagnes d'optimisation de composés pourront être conduites (notamment dans le sens d'optimisation des seuls Apicomplexes). Enfin, et avant d'envisager toute perspective dans le cadre d'une thérapie humaine, la synthèse de ces nouveaux analogues devra notamment s'attacher à améliorer l'absorption des composés dans le but de tester *in vivo* leurs effets anti-parasitaires sur modèle murin, infecté par *Plasmodium vinckei*.

Références bibliographiques

A

- Adisa, A., Rug, M., Foley, M. & Tilley, L. (2002). Characterisation of a delta-COP homologue in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 123(1): 11-21.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. & Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52(5): 399-451.
- Aikawa, M., Miller, L. H., Johnson, J. & Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol* 77(1): 72-82.
- Alexander, D. L., Arastu-Kapur, S., Dubremetz, J.-F. & Boothroyd, J. C. (2006). *Plasmodium falciparum* AMA1 Binds a Rhoptry Neck Protein Homologous to TgRON4, a Component of the Moving Junction in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell* 5(7): 1169-1173.
- Ancelin, M. L., Calas, M., Bompard, J., Cordina, G., Martin, D., Ben Bari, M., Jei, T., Druilhe, P. & Vial, H. J. (1998). Antimalarial activity of 77 phospholipid polar head analogs: close correlation between inhibition of phospholipid metabolism and in vitro *Plasmodium falciparum* growth. *Blood* 91(4): 1426-1437.
- Ancelin, M. L., Calas, M., Bonhoure, A., Herbute, S. & Vial, H. J. (2003a). In vivo antimalarial activities of mono- and bis quaternary ammonium salts interfering with *Plasmodium* phospholipid metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* 47(8): 2598-2605.
- Ancelin, M. L., Calas, M., Vidal-Sailhan, V., Herbute, S., Ringwald, P. & Vial, H. J. (2003b). Potent Inhibitors of *Plasmodium* Phospholipid Metabolism with a Broad Spectrum of In Vitro Antimalarial Activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(8): 2590-2597.
- Andersson, M. X., Larsson, K. E., Tjellstrom, H., Liljenberg, C. & Sandelius, A. S. (2005). Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* 280(30): 27578-27586.
- Andersson, M. X., Stridh, M. H., Larsson, K. E., Liljenberg, C. & Sandelius, A. S. (2003). Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett* 537(1-3): 128-132.
- Ansorge, I., Jeckel, D., Wieland, F. & Lingelbach, K. (1995). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes utilize a synthetic truncated ceramide precursor for synthesis and secretion of truncated sphingomyelin. *Biochem J* 308 (Pt 1): 335-341.
- Arispe, N., Doh, M. & De Maio, A. (2002). Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70. *Cell Stress Chaperones* 7(4): 330-338.
- Awai, K., Marechal, E., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H. & Joyard, J. (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10960-10965.

B

- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Dluzewski, A. R., Margos, G., Williams, I. T., Blackman, M. J., Kocken, C. H., Thomas, A. W. & Mitchell, G. H. (2003). *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J Cell Sci* 116(18): 3825-3834.

- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. & Mitchell, G. H. (2000). Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. *Parasitology* 121 (Pt 3): 273-287.
- Basco, L. K., Ramilarisoa, O. & Le Bras, J. (1994). In vitro activity of pyrimethamine, cycloguanil, and other antimalarial drugs against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 50(2): 193-199.
- Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnjanski, Z., Gilberger, T.-W., Green, J. L., Holder, A. A. & Cowman, A. F. (2006). A Conserved Molecular Motor Drives Cell Invasion and Gliding Motility across Malaria Life Cycle Stages and Other Apicomplexan Parasites. *J. Biol. Chem.* 281(8): 5197-5208.
- Baunaure, F., Eldin, P., Cathiard, A.-M. & Vial, H. (2004). Characterization of a non-mitochondrial type I phosphatidylserine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* 51(1): 33-46.
- Bayer, E. A. & Wilchek, M. (1990). Avidin column as a highly efficient and stable alternative for immobilization of ligands for affinity chromatography. *J Mol Recognit* 3(3): 102-107.
- Beaumelle, B. D. & Vial, H. J. (1986). Modification of the fatty acid composition of individual phospholipids and neutral lipids after infection of the simian erythrocyte by *Plasmodium knowlesi*. *Biochim Biophys Acta* 877(2): 262-270.
- Benning, C. & Ohta, H. (2005). Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem* 280(4): 2397-2400.
- Billker, O., Miller, A. J. & Sinden, R. E. (2000). Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ion-selective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis. *Parasitology* 120 (Pt 6): 547-551.
- Birkholtz, L., van Brummelen, A. C., Clark, K., Niemand, J., Marechal, E., Llinas, M. & Louw, A. I. (2008). Exploring functional genomics for drug target and therapeutics discovery in Plasmodia. *Acta Tropica* 105(2): 113-123.
- Bisanz, C., Bastien, O., Grando, D., Jouhet, J., Marechal, E. & Cesbron-Delauw, M. F. (2006a). *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J* 394(Pt 1): 197-205.
- Bisanz, C., Botte, C., Saidani, N., Bastien, O., Cesbron-Delauw, M. F. & Marechal, E. (2006b). Structure, function and biogenesis of the secondary plastid of apicomplexan parasites. . *Current Research in Plant Cell Compartments* In press.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917.
- Bosch, J., Buscaglia, C. A., Krumm, B., Ingason, B. P., Lucas, R., Roach, C., Cardozo, T., Nussenzweig, V. & Hol, W. G. (2007). Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(17): 7015-7020.
- Botte, C. (2007). Etudes structurales, cellulaires et pharmacologiques de la synthèse des galactolipides chez *Arabidopsis thaliana* et *Toxoplasma gondii*. . *Biologie* PhD., Grenoble: Université Joseph Fourier Grenoble I.
- Botte, C., Jeanneau, C., Snajdrova, L., Bastien, O., Imbert, A., Breton, C. & Marechal, E. (2005). Molecular modelling and site directed mutagenesis of plant chloroplast MGDG synthase reveal critical residues for activity. *J Biol Chem.*
- Botte, C., Saidani, N., Mondragon, R., Mondragon, M., Isaac, G., Mui, E., McLeod, R., Dubremetz, J. F., Vial, H., Welti, R., Cesbron-Delauw, M. F., Mercier, C. & Marechal, E. (2008). Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like eitope in *Toxoplasma gondii*. *J Lipid Res.*
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J. & DeRisi, J. L. (2003). The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 1(1): E5.

C

Carter, R., Ranford-Cartwright, L. & Alano, P. (1993). The culture and preparation of gametocytes of *Plasmodium falciparum* for immunochemical, molecular, and mosquito infectivity studies. *Methods Mol Biol* 21: 67-88.

Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Merz, K. M., Pearlman, D. A., Crowley, M., Walker, R. C., Zhang, W., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Wong, K. F., Paesani, F., Wu, X., Brozell, S., Tsui, V., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Beroza, P., Mathews, D. H., Schafmeister, C., Ross, W. S. & Kollman, P. A. (2006). AMBER 9, University of California, San Francisco.

Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci* 271(1545): 1251-1262.

Chandrakala, B., Shandil, R. K., Mehra, U., Ravishankar, S., Kaur, P., Usha, V., Joe, B. & de Sousa, S. M. (2004). High-throughput screen for inhibitors of transglycosylase and/or transpeptidase activities of *Escherichia coli* penicillin binding protein 1b. *Antimicrob Agents Chemother* 48(1): 30-40.

Choubey, V., Maity, P., Guha, M., Kumar, S., Srivastava, K., Puri, S. K. & Bandyopadhyay, U. (2007). Inhibition of *Plasmodium falciparum* choline kinase by hexadecyltrimethylammonium bromide: a possible antimalarial mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 51(2): 696-706.

Cooke, B. M., Lingelbach, K., Bannister, L. H. & Tilley, L. (2004). Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol.* 20: 581-589.

Coppens, I. & Vielemeyer, O. (2005). Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. *International Journal for Parasitology* 35(6): 597-615.

Couto, A. S., Caffaro, C., Uhrig, M. L., Kimura, E., Peres, V. J., Merino, E. F., Katzin, A. M., Nishioka, M., Nonami, H. & Erra-Balsells, R. (2004). Glycosphingolipids in *Plasmodium falciparum*. Presence of an active glucosylceramide synthase. *European Journal of Biochemistry* 271(11): 2204-2214.

D

Dahl, E. L. & Rosenthal, P. J. (2007). Multiple Antibiotics Exert Delayed Effects against the *Plasmodium falciparum* Apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(10): 3485-3490.

Debierre-Grockiego, F., Schofield, L., Azzouz, N., Schmidt, J., Santos de Macedo, C., Ferguson, M. A. & Schwarz, R. T. (2006). Fatty acids from *Plasmodium falciparum* down-regulate the toxic activity of malaria glycosylphosphatidylinositols. *Infect Immun* 74(10): 5487-5496.

Deitsch, K. W. & Wellems, T. E. (1996). Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 76(1-2): 1-10.

Delorenzi, M., Sexton, A., Shams-Eldin, H., Schwarz, R. T., Speed, T. & Schofield, L. (2002). Genes for glycosylphosphatidylinositol toxin biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 70(8): 4510-4522.

Dembitsky, V. M., Rezanka, T. & Srebnik, M. (2003). Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae. *Chem Phys Lipids* 123(2): 117-155.

Desjardins, R. E., Canfield, C. J., Haynes, J. D. & Chulay, J. D. (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16(6): 710-718.

Dhermy, D., Schrevel, J. & Lecomte, M. C. (2007). Spectrin-based skeleton in red blood cells and malaria. *Curr Opin Hematol* 14(3): 198-202.

Divo, A. A., Geary, T. G. & Jensen, J. B. (1985). Oxygen- and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on *Plasmodium falciparum* in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27(1): 21-27.

Bluzewski, A. R., Zicha, D., Dunn, G. A. & Gratzner, W. B. (1995). Origins of the parasitophorous vacuole membrane of the malaria parasite: surface area of the parasitized red cell. *Eur J Cell Biol* 68(4): 446-449.

Dodge, J. T. & Phillips, G. B. (1967). Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids and aldehydes in human red cells. *J Lipid Res* 8(6): 667-675.

Donald, R. G. K., Carter, D., Ullman, B. & Roos, D. S. (1996). Insertional Tagging, Cloning, and Expression of the *Toxoplasma gondii* Hypoxanthine-Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Gene. USE AS A SELECTABLE MARKER FOR STABLE TRANSFORMATION. *J. Biol. Chem.* 271(24): 14010-14019.

Dowhan, W. & Bogdanov, M. (2002). Functional roles of lipids in membranes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* 4th edition: 1-35.

Duffy, P. E. & Sibley, C. H. (2005). Are we losing artemisinin combination therapy already? *Lancet* 366(9501): 1908-1909.

E

Ebers, G. M. & Stern, L. (1875). Papyrus Ebers. Facsimile with a partial translation. .

Elliott, D. A., McIntosh, M. T., Hosgood, H. D., III, Chen, S., Zhang, G., Baevova, P. & Joiner, K. A. (2008). Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(7): 2463-2468.

Elmendorf, H. G. & Haldar, K. (1994). *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J. Cell Biol.* 124(4): 449-462.

Eyster, K. M. (2007). The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ* 31(1): 5-16.

F

Ferro, M., Salvi, D., Riviere-Rolland, H., Vermet, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J. & Rolland, N. (2002). Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 11487-11492.

Fidock, D. A., Nomura, T. & Welles, T. E. (1998). Cycloguanil and Its Parent Compound Proguanil Demonstrate Distinct Activities against *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Transformed with Human Dihydrofolate Reductase. *Mol Pharmacol* 54(6): 1140-1147.

Florens, L. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419: 520-526.

Foley, M., Deady, L. W., Ng, K., Cowman, A. F. & Tilley, L. (1994). Photoaffinity labeling of chloroquine-binding proteins in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 269(9): 6955-6961.

Foth, B. J., Ralph, S. A., Tonkin, C. J., Struck, N. S., Fraunholz, M., Roos, D. S., Cowman, A. F. & McFadden, G. I. (2003). Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 299(5607): 705-708.

Frischknecht, F. & Lanzer, M. (2008). The *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts in 3D. *Mol Microbiol* 67(4): 687-691.

G

Gad, M., Awai, K., Shimojima, M., Yamaryo, Y., Shimada, H., Masuda, T., Takamiya, K., Ikai, A. & Ohta, H. (2001). Accumulation of plant galactolipid affects cell morphology of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 286(1): 114-118.

Gardner, M. J., Feagin, J. E., Moore, D. J., Rangachari, K., Williamson, D. H. & Wilson, R. J. (1993). Sequence and organization of large subunit rRNA genes from the extrachromosomal 35 kb circular DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* 21(5): 1067-1071.

Gardner, M. J., Feagin, J. E., Moore, D. J., Spencer, D. F., Gray, M. W., Williamson, D. H. & Wilson, R. J. (1991a). Organisation and expression of small subunit ribosomal RNA genes encoded by a 35-kilobase circular DNA in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 48(1): 77-88.

Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M.

- &Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419(6906): 498-511.
- Gardner, M. J., Williamson, D. H. &Wilson, R. J. (1991b). A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. *Mol Biochem Parasitol* 44(1): 115-123.
- Gerold, P., Dieckmann-Schuppert, A. &Schwarz, R. T. (1994). Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J Biol Chem* 269(4): 2597-2606.
- Gerold, P., Jung, N., Azzouz, N., Freiberg, N., Kobe, S. &Schwarz, R. T. (1999). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* in a cell-free incubation system: inositol acylation is needed for mannosylation of glycosylphosphatidylinositols. *Biochem J* 344 Pt 3: 731-738.
- Gerold, P., Schofield, L., Blackman, M. J., Holder, A. A. &Schwarz, R. T. (1996). Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 75(2): 131-143.
- Gerold, P. &Schwarz, R. T. (2001). Biosynthesis of glycosphingolipids de-novo by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 112(1): 29-37.
- Ghoneim, A., Kaneko, O., Tsuboi, T. &Torii, M. (2007). The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries. *Parasitology International* 56(1): 31-43.
- Gilson, P. R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R. L., Sargeant, T., Speed, T. P., Schofield, L. &Crabb, B. S. (2006). Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics* 5(7): 1286-1299.
- Goodman, C. D., Su, V. &McFadden, G. I. (2007). The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 152(2): 181-191.
- Gorenflot, A., Brasseur, P., Precigout, E., L'Hostis, M., Marchand, A. &Schrevel, J. (1991). Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: ox, gerbil, man. *Parasitol Res* 77(1): 3-12.
- Gornicki, P. (2003). Apicoplast fatty acid biosynthesis as a target for medical intervention in apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology* 33(9): 885-896.
- Grellier, P., Rigomier, D., Clavey, V., Fruchart, J. C. &Schrevel, J. (1991). Lipid traffic between high density lipoproteins and *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *J. Cell Biol.* 112(2): 267-277.
- Guerra, C., Hay, S., Luciparedes, L., Gikandi, P., Tatem, A., Noor, A. &Snow, R. (2007). Assembling a global database of malaria parasite prevalence for the Malaria Atlas Project. *Malaria Journal* 6(1): 17.
- Guerra, C. A., Gikandi, P. W., Tatem, A. J., Noor, A. M., Smith, D. L., Hay, S. I. &Snow, R. W. (2008). The Limits and Intensity of *Plasmodium falciparum* Transmission: Implications for Malaria Control and Elimination Worldwide. *PLoS Medicine* 5(2): e38.

H

- Haldar, K. (1996). Sphingolipid synthesis and membrane formation by *Plasmodium*. *Trends in Cell Biology* 6(10): 398-405.
- Haldar, K. (1998). Intracellular trafficking in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Current Opinion in Microbiology* 1(4): 466-471.
- Haldar, K., de Amorim, A. F. &Cross, G. A. (1989). Transport of fluorescent phospholipid analogues from the erythrocyte membrane to the parasite in *Plasmodium falciparum*-infected cells. *J Cell Biol* 108(6): 2183-2192.
- Haldar, K., Mohandas, N., Samuel, B. U., Harrison, T., Hiller, N. L., Akompong, T. &Cheresh, P. (2002). Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cellular Microbiology* 4(7): 383-395.

Hanada, K., Mitamura, T., Fukasawa, M., Magistrado, P. A., Horii, T. & Nishijima, M. (2000). Neutral sphingomyelinase activity dependent on Mg²⁺ and anionic phospholipids in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 346 Pt 3: 671-677.

Hanada, K., Palacpac, N. M., Magistrado, P. A., Kurokawa, K., Rai, G., Sakata, D., Hara, T., Horii, T., Nishijima, M. & Mitamura, T. (2002). *Plasmodium falciparum* phospholipase C hydrolyzing sphingomyelin and lysocholinephospholipids is a possible target for malaria chemotherapy. *J Exp Med* 195(1): 23-34.

He, C. Y., Shaw, M. K., Pletcher, C. H., Striepen, B., Tilney, L. G. & Roos, D. S. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Embo J* 20(3): 330-339.

Healer, J., Crawford, S., Ralph, S., McFadden, G. & Cowman, A. F. (2002). Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun* 70(10): 5751-5758.

Hedfalk, K., Pettersson, N., Oberg, F., Hohmann, S. & Gordon, E. (2008). Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin. *Protein Expr Purif* 59(1): 69-78.

Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., Wilson, I., Mitchell, G. & Bannister, L. (1999). The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. *Protist* 150(3): 283-295.

Hsiao, L. L., Howard, R. J., Aikawa, M. & Taraschi, T. F. (1991). Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 274 (Pt 1): 121-132.

I

Isokpehi, R. D. & Hide, W. A. (2003). Integrative analysis of intraerythrocytic differentially expressed transcripts yields novel insights into the biology of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2(1): 38.

J

Jackson, K. E., Klonis, N., Ferguson, D. J. P., Adisa, A., Dogovski, C. & Tilley, L. (2004). Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* 54(1): 109-122.

Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, M. T., Bouchier, C., Esterre, P., Fandeur, T. & Mercereau-Puijalon, O. (2005). Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 366(9501): 1960-1963.

Joiner, K. A. & Roos, D. S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J. Cell Biol.* 157(4): 557-563.

Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., uuml, rbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D. & Beck, E. (1999). Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs. *Science* 285(5433): 1573-1576.

Jouhet, J., Marechal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. & Block, M. A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* 167(5): 863-874.

Jouhet, J., Marechal, E. & Block, M. A. (2007). Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog Lipid Res* 46(1): 37-55.

K

Kaneko, O. (2007). Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the *Plasmodium* rhoptry. *Parasitol Int* 56(4): 255-262.

Kats, L. M., Black, C. G., Proellocks, N. I. & Coppel, R. L. (2006). *Plasmodium* rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol* 22(6): 269-276.

Kats, L. M., Cooke, B. M., Coppel, R. L. & Black, C. G. (2008). Protein trafficking to apical organelles of malaria parasites - building an invasion machine. *Traffic* 9(2): 176-186.

- Kennedy, E. P., Smith, S. W. & Weiss, S. B. (1956). New synthesis of lecithin in an isolated enzyme system. *Nature* 178(4533): 594-595.
- Kimura, E. A., Couto, A. S., Peres, V. J., Casal, O. L. & Katzin, A. M. (1996). N-linked glycoproteins are related to schizogony of the intraerythrocytic stage in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 271(24): 14452-14461.
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. & Ohta, H. (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(43): 17216-17221.
- Kohler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J. M., Palmer, J. D. & Roos, D. S. (1997). A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites. *Science* 275(5305): 1485-1489.
- Kooij, T. W., Janse, C. J. & Waters, A. P. (2006). *Plasmodium* post-genomics: better the bug you know? *Nat Rev Microbiol* 4(5): 344-357.
- Kuhn, Y., Rohrbach, P. & Lanzer, M. (2007). Quantitative pH measurements in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using pHluorin. *Cellular Microbiology* 9(4): 1004-1013.

L

- Landoni, M., Duschak, V. G., Peres, V. J., Nonami, H., Erra-Balsells, R., Katzin, A. M. & Couto, A. S. (2007). *Plasmodium falciparum* biosynthesizes sulfoglycosphingolipids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 154(1): 22-29.
- Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L. & Braun Breton, C. (2006). Maurer's clefts: A novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *International Journal for Parasitology* 36(1): 23-36.
- Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B. U., Hiller, N. L., Mohandas, N. & Haldar, K. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J* 19(14): 3556-3564.
- Lauer, S. A., Ghori, N. & Haldar, K. (1995). Sphingolipid synthesis as a target for chemotherapy against malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9181-9185.
- Lauer, S. A., Rathod, P. K., Ghori, N. & Haldar, K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* 276(5315): 1122-1125.
- Laveran, A. (1881). Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. *J-B. Baillière et fils, Paris*.
- Le Roch, K. G., Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., De La Vega, P., Holder, A. A., Batalov, S., Carucci, D. J. & Winzeler, E. A. (2003). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* 301(5639): 1503-1508.
- Ledoux, M., Laloux, L. & RL, W. (2000). Analytical methods for determination of trans-C18 fatty acid isomers in milk fat. A review. *Analisis* 28(5): 402-412.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 27(1): 37-58.
- Ling, I. T., Kaneko, O., Narum, D. L., Tsuboi, T., Howell, S., Taylor, H. M., Scott-Finnigan, T. J., Torii, M. & Holder, A. A. (2003). Characterisation of the rhoph2 gene of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 127(1): 47-57.
- Lu, J. Z., Muench, S. P., Allary, M., Campbell, S., Roberts, C. W., Mui, E., McLeod, R. L., Rice, D. W. & Prigge, S. T. (2007). Type I and type II fatty acid biosynthesis in *Eimeria tenella*: enoyl reductase activity and structure. *Parasitology* 134(Pt.14): 1949-1962.

M

- Maréchal, E. (1994). Purification et étude de la MGDG synthase de l'enveloppe des chloroplastes d'épinard. *Biologie* PhD.178, Grenoble: Université Joseph Fourier Grenoble I.

- Marechal, E., Azzouz, N., de Macedo, C. S., Block, M. A., Feagin, J. E., Schwarz, R. T. & Joyard, J. (2002). Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. *Eukaryot Cell* 1(4): 653-656.
- Marechal, E., Miege, C., Block, M. A., Douce, R. & Joyard, J. (1995). The catalytic site of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. Biochemical analysis of the structure and of the metal content. *J Biol Chem* 270(11): 5714-5722.
- Marechal, E., Miras, S. & Joyard, J. (2000). Fractions membranaires de cellules enrichies en 1,2-sn-diacylglycérol, procédé de préparation et utilisation. Dépôt de Brevet-France numéro 0013976 (2001: extension Canada/USA/Japon/Australie).
- Margos, G., Bannister, L. H., Dluzewski, A. R., Hopkins, J., Williams, I. T. & Mitchell, G. H. (2004). Correlation of structural development and differential expression of invasion-related molecules in schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 129(Pt 3): 273-287.
- Martin, R., Henry, R., Abbey, J., Clements, J. & Kirk, K. (2005). The 'permeome' of the malaria parasite: an overview of the membrane transport proteins of *Plasmodium falciparum*. *Genome Biology* 6(3): R26.
- Martin, R. E. & Kirk, K. (2004). The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Mol Biol Evol* 21(10): 1938-1949.
- Mazumdar, J., E, H. W., Masek, K., C, A. H. & Striepen, B. (2006). Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35): 13192-13197.
- Menting, J. G., Tilley, L., Deady, L. W., Ng, K., Simpson, R. J., Cowman, A. F. & Foley, M. (1997). The antimalarial drug, chloroquine, interacts with lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 88(1-2): 215-224.
- Meshnick, S. R., Taylor, T. E. & Kamchonwongpaisan, S. (1996). Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev* 60(2): 301-315.
- Miege, C., Marechal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M. A., Ohta, H., Takamiya, K.-i., Douce, R. & Joyard, J. (1999). Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur J Biochem* 265(3): 990-1001.
- Mikkelsen, R. B., Kamber, M., Wadwa, K. S., Lin, P. S. & Schmidt-Ullrich, R. (1988). The role of lipids in *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes: a coordinated biochemical and microscopic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(16): 5956-5960.
- Mitamura, T., Hanada, K., Ko-Mitamura, E. P., Nishijima, M. & Horii, T. (2000). Serum factors governing intraerythrocytic development and cell cycle progression of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int* 49(3): 219-229.
- Moll, G. N., Vial, H. J., Ancelin, M. L., Op den Kamp, J. A. F., Roelofsen, B. & van Deenen, L. L. M. (1988). Phospholipid uptake by *Plasmodium knowlesi* infected erythrocytes. *FEBS Letters* 232(2): 341-346.
- Mullin, K. A., Lim, L., Ralph, S. A., Spurck, T. P., Handman, E. & McFadden, G. I. (2006). Membrane transporters in the relict plastid of malaria parasites. *PNAS*: 0602293103.

N

- Nawabi, P., Lykidis, A., Ji, D. & Haldar, K. (2003). Neutral-Lipid Analysis Reveals Elevation of Acylglycerols and Lack of Cholesterol Esters in *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *Eukaryotic Cell* 2(5): 1128-1131.
- Newton, P. & White, N. (1999). Malaria: new developments in treatment and prevention. *Annu Rev Med* 50: 179-192.
- Nishiyama, Y., Hardre-Lienard, H., Miras, S., Miege, C., Block, M. A., Revah, F., Joyard, J. & Marechal, E. (2003). Refolding from denatured inclusion bodies, purification to homogeneity and simplified assay of MGDG synthases from land plants. *Protein Expression and Purification* 31(1): 79.

Nkrumah, L. J., Muhle, R. A., Moura, P. A., Ghosh, P., Hatfull, G. F., Jacobs, W. R. & Fidock, D. A. (2006). Efficient site-specific integration in *Plasmodium falciparum* chromosomes mediated by mycobacteriophage Bxb1 integrase. *Nat Meth* 3(8): 615-621.

O

Oakley, M. S. M., Kumar, S., Anantharaman, V., Zheng, H., Mahajan, B., Haynes, J. D., Moch, J. K., Fairhurst, R., McCutchan, T. F. & Aravind, L. (2007). Molecular Factors and Biochemical Pathways Induced by Febrile Temperature in Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* Parasites. *Infect. Immun.* 75(4): 2012-2025.

OMS (2005). World Malaria Report *Roll Back Malaria-World Health Organization-Unicef, Geneva*.

Op den Kamp, J. (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* 48: 47-71.

P

Palacpac, N. M., Hiramane, Y., Mi-ichi, F., Torii, M., Kita, K., Hiramatsu, R., Horii, T. & Mitamura, T. (2004). Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1469-1480.

Pavithra, S. R., Kumar, R. & Tatu, U. (2007). Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Comput Biol* 3(9): 1701-1715.

Pessi, G., Kociubinski, G. & Mamoun, C. B. (2004). A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16): 6206-6211.

Pinder, J., Fowler, R., Bannister, L., Dluzewski, A. & Mitchell, G. H. (2000). Motile systems in malaria merozoites: how is the red blood cell invaded? *Parasitol Today* 16(6): 240-245.

Pink, R., Hudson, A., Mouries, M. A. & Bendig, M. (2005). Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4(9): 727-740.

Q

Quevillon, E., Spielmann, T., Brahimi, K., Chattopadhyay, D., Yeramian, E. & Langsley, G. (2003). The *Plasmodium falciparum* family of Rab GTPases. *Gene* 306: 13-25.

R

Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos, D. S. & McFadden, G. I. (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol* 2(3): 203-216.

Richards, W. H. & Maples, B. K. (1979). Studies on *Plasmodium falciparum* in continuous cultivation. I. The effect of chloroquine and pyrimethamine on parasite growth and viability. *Ann Trop Med Parasitol* 73(2): 99-108.

Roberts, C. W., McLeod, R., Rice, D. W., Ginger, M., Chance, M. L. & Goad, L. J. (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 126(2): 129-142.

Ross, R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. *Br Med J*. 2(1929): 1786-1788.

S

Saidani, N., Grando, D., Valadie, H., Bastien, O. & Marechal, E. (2008). Potential and limits of in silico target discovery-Case study of the search for new antimalarial chemotherapeutic targets. *Infect Genet Evol.*

Saliba, K. J., Folb, P. I. & Smith, P. J. (1998). Role for the *plasmodium falciparum* digestive vacuole in chloroquine resistance. *Biochem Pharmacol* 56(3): 313-320.

Schauer, R., Wember, M. & Howard, R. J. (1984). Malaria parasites do not contain or synthesize sialic acids. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 365(2): 185-194.

- Schmitz, S., Grainger, M., Howell, S., Calder, L. J., Gaeb, M., Pinder, J. C., Holder, A. A. & Veigel, C. (2005). Malaria parasite actin filaments are very short. *J Mol Biol* 349(1): 113-125.
- Schofield, L. & Hackett, F. (1993). Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 177(1): 145-153.
- Schwartz, R. S., Olson, J. A., Raventos-Suarez, C., Yee, M., Heath, R. H., Lubin, B. & Nagel, R. L. (1987). Altered plasma membrane phospholipid organization in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood* 69(2): 401-407.
- Shanks, G. D. (2006). Treatment of falciparum malaria in the age of drug resistance. *J Postgrad Med* 52(4): 277-280.
- Sherwood, J. A., Spitalnik, S. L., Aley, S. B., Quakyl, I. A. & Howard, R. J. (1986). *Plasmodium falciparum* and *P. knowlesi*: initial identification and characterization of malaria synthesized glycolipids. *Experimental Parasitology* (62): 127-141.
- Shimajima, M., Ohta, H., Iwamatsu, A., Masuda, T., Shioi, Y. & Takamiya, K. (1997). Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1): 333-337.
- Sidhu, A. B., Uhlemann, A. C., Valderramos, S. G., Valderramos, J. C., Krishna, S. & Fidock, D. A. (2006). Decreasing pfmdr1 copy number in plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* 194(4): 528-535.
- Sidhu, A. B. S., Valderramos, S. G. & Fidock, D. A. (2005). pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* 57(4): 913-926.
- Simoes, A. P., Fiebig, S., Wunderlich, F., Vial, H., Roelofsen, B. & Op den Kamp, J. A. (1993). *Plasmodium chabaudi*-parasitized erythrocytes: phosphatidylcholine species of parasites and host cell membranes. *Mol Biochem Parasitol* 57(2): 345-348.
- Simoes, A. P., Roelofsen, B. & Op den Kamp, J. A. (1992). Incorporation of free fatty acids can explain alterations in the molecular species composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in human erythrocytes as induced by *Plasmodium falciparum*. *Cell Biol Int Rep* 16(6): 533-545.
- Simpson, A. G. & Roger, A. J. (2004). The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol* 14(17): R693-696.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(23): 720-731.
- Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-Singh, J., Thomas, A. & Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet* 363(9414): 1017-1024.
- Sinkula, A. A., Morozowich, W., Lewis, C. & MacKellar, F. A. (1969). Synthesis and bioactivity of lincomycin-7-monoesters. *J Pharm Sci* 58(11): 1389-1392.
- Smith, C. (1971). Occurrence of unusual fatty acids in plants. *Progress in Chemistry of Fats other Lipids* 11: 137-177.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y. & Hay, S. I. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434(7030): 214-217.
- Spycher, C., Rug, M., Klonis, N., Ferguson, D. J., Cowman, A. F., Beck, H. P. & Tilley, L. (2006). Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Cell Biol* 26(11): 4074-4085.
- Struck, N. S., de Souza Dias, S., Langer, C., Marti, M., Pearce, J. A., Cowman, A. F. & Gilberger, T. W. (2005). Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP. *J Cell Sci* 118(Pt 23): 5603-5613.
- Struck, N. S., Herrmann, S., Schmuck-Barkmann, I., de Souza Dias, S., Haase, S., Cabrera, A. L., Treeck, M., Bruns, C., Langer, C., Cowman, A. F., Marti, M., Spielmann, T. & Gilberger, T. W. (2008). Spatial dissection of the cis- and trans-Golgi compartments in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 67(6): 1320-1330.

Surolia, A., Ramya, T. N., Ramya, V. & Surolia, N. (2004). 'FAS't inhibition of malaria. *Biochem J* 383(Pt. 3): 401-412.

Surolia, N. & Padmanaban, G. (1992). de novo biosynthesis of heme offers a new chemotherapeutic target in the human malarial parasite. *Biochem Biophys Res Commun* 187(2): 744-750.

Surolia, N. & Surolia, A. (2001). Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat Med* 7(2): 167-173.

T

Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A. & Williamson, P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272(5267): 1495-1497.

Tilley, L., Sougrat, R., Lithgow, T. & Hanssen, E. (2008). The twists and turns of Maurer's cleft trafficking in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Traffic* 9(2): 187-197.

Torii, M., Adams, J. H., Miller, L. H. & Aikawa, M. (1989). Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infect. Immun.* 57(10): 3230-3233.

Trager, W. & Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193(4254): 673-675.

Trape, J. F. (2001). The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 64(1_suppl): 12-17.

Triglia, T., Menting, J. G., Wilson, C. & Cowman, A. F. (1997). Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13944-13949.

V

van Dooren, G. G., Marti, M., Tonkin, C. J., Stimmler, L. M., Cowman, A. F. & McFadden, G. I. (2005). Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 57(2): 405-419.

van Dooren, G. G., Waller, R. F., McFadden, G. I., Joiner, K. A. & Roos, D. S. (2000). Traffic Jams: Protein Transport in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* 16(10): 421-427.

Vennerstrom, J. L., Nuzum, E. O., Miller, R. E., Dorn, A., Gerena, L., Dande, P. A., Ellis, W. Y., Ridley, R. G. & Milhous, W. K. (1999). 8-Aminoquinolines active against blood stage *Plasmodium falciparum* in vitro inhibit hematin polymerization. *Antimicrob Agents Chemother* 43(3): 598-602.

Vial, H. & Ben Mamoun, C. (2005). *Plasmodium* lipids: metabolism and function. . *Molecular approaches to malaria*.

Vial, H. J., Ancelin, M. L., Philippot, J. R. & Thuet, M. J. (1990). Biosynthesis and dynamics of lipids in *Plasmodium*-infected mature mammalian erythrocytes. *Blood Cells* 16(2-3): 531-555; discussion 556-561.

Vial, H. J., Eldin, P., Tielens, A. G. M. & van Hellemond, J. J. (2003). Phospholipids in parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126(2): 143-154.

Vial, H. J., Wein, S., Farenc, C., Kocken, C., Nicolas, O., Ancelin, M. L., Bressolle, F., Thomas, A. & Calas, M. (2004). Prodrugs of bisthiazolium salts are orally potent antimalarials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(43): 15458-15463.

Vielemeyer, O., McIntosh, M. T., Joiner, K. A. & Coppens, I. (2004). Neutral lipid synthesis and storage in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 135(2): 197-209.

Vincensini, L., Fall, G., Berry, L., Blisnick, T. & Braun Breton, C. (2008). The RhopH complex is transferred to the host cell cytoplasm following red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*.

Vincensini, L., Richert, S., Blisnick, T., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Rabilloud, T. & Braun Breton, C. (2005). Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell. *Mol Cell Proteomics* 4(4): 582-593.

von Itzstein, M., Plebanski, M., Cooke, B. M. & Coppel, R. L. (2008). Hot, sweet and sticky: the glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology* 24(5): 210-218.

Vuillard, L., Braun-Breton, C. & Rabilloud, T. (1995). Non-detergent sulphobetaines: a new class of mild solubilization agents for protein purification.

Vuillard L, Bra.

W

Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G. K., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S. & McFadden, G. I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *PNAS* 95(21): 12352-12357.

Waller, R. F. & McFadden, G. I. (2005). The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol* 7(1): 57-79.

Waller, R. F., Reed, M. B., Cowman, A. F. & McFadden, G. I. (2000). Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J.* 19(8): 1794-1802.

Wengelnik, K., Vidal, V., Ancelin, M. L., Cathiard, A. M., Morgat, J. L., Kocken, C. H., Calas, M., Herrera, S., Thomas, A. W. & Vial, H. J. (2002). A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. *Science* 295(5558): 1311-1314.

Wiesner, J. & Seeber, F. (2005). The plastid-derived organelle of protozoan human parasites as a target of established and emerging drugs. *Expert Opin Ther Targets* 9(1): 23-44.

Wilson, R. J., Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., Moore, P. W. & Williamson, D. H. (1996). Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 261(2): 155-172.

Wilson, R. J. M. (2005). Parasite plastids: approaching the endgame. *Biological Reviews* 80(1): 129-153.

Winstanley, P., Ward, S. & David, H. M. (2006). Malaria Chemotherapy. In *Advances in Parasitology*, Vol. Volume 61, 47-76: Academic Press.

Wuchty, S. & Ipsaro, J. J. (2007). A draft of protein interactions in the malaria parasite *P. falciparum*. *J Proteome Res* 6(4): 1461-1470.

Y

Yeoh, S., O'Donnell, R. A., Koussis, K., Dluzewski, A. R., Ansell, K. H., Osborne, S. A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G. H., Bannister, L. H., Bryans, J. S., Kettleborough, C. A. & Blackman, M. J. (2007). Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* 131(6): 1072-1083.

Z

Zhu, G. (2004). Current progress in the fatty acid metabolism in *Cryptosporidium parvum*. *J Eukaryot Microbiol* 51(4): 381-388.

Zhu, G., Marchewka, M. J., Woods, K. M., Upton, S. J. & Keithly, J. S. (2000). Molecular analysis of a Type I fatty acid synthase in *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* 105(2): 253-260.

ANNEXE : TABLEAUX 1 et 2

ANNEXE Tableau 1 : Optimisation des molécules dérivées de la structure moléculaire de A1B1C1_1 et A1B1C2_1 pour les propriétés inhibitrices de la MGDG synthase (mesurées sur enzyme native dans des fractions homogènes d'enveloppe de chloroplastes d'épinard), herbicides (*Arabidopsis* en culture), algistatiques (*Chlamydomonas* en culture liquide), antiparasitaires (*Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*) en comparaison de la cytotoxicité mesurée *in vitro* sur modèle érythroblastes humains (de lignée K-562). Les mesures *Toxoplasma gondii* ont été réalisées par C. Botté (Laboratoire PCV, CEA de Grenoble, et Laboratoire d'adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Institut Jean Roget de Grenoble). Les mesures sur MGDG synthase *in vitro*, sur *Arabidopsis* et sur *Chlamydomonas* ont été réalisées par Amélie Zoppé (Laboratoire PCV, CEA de Grenoble). Les mesures sur *Plasmodium falciparum* et lignée cellulaire humaines ont été réalisées dans le cadre de ce travail de thèse.

Un encodage permet de repérer les molécules les plus actives :
sur parasites

en vert vif :	< 1 μ M
en vert clair :	1 à 2 μ M
en bleu clair :	2 à 10 μ M
en violet :	10 à 20 μ M
en pourpre :	> 20 μ M

côté drogues sur enzyme de plante

en vert clair :	10 à 20 μ M
en bleu clair :	20 à 100 μ M
en violet :	> 100 μ M
en pourpre :	pas d'effet mesurable

côté drogues sur érythroblastes

en brun foncé :	< 10 μ M
en brun clair :	10 à 50 μ M
en orange :	50 à 200 μ M
en jaune :	> 200 μ M

côté drogues sur *Arabidopsis* et *Chlamydomonas*

en vert vif :	< 10 μ M
en vert clair :	10-100 μ M
en bleu clair :	100-200 μ M
en violet :	> 200 μ M
en pourpre :	pas d'effet mesurable

Produits	Références Produits	Caractéristique		MGDG synthase	Arabidopsis	Chlamydomonas	Toxoplasma	Plasmodium	Humain
		MW	Formule Chimique	Synthèse de MGDG dans l'enveloppe de chloroplastes d'épinards	Test croissance sur milieu gélosé complétement avec les molécules (tient compte de l'hydrophobicité)	Test prolifération souche 11.32a (mt+)	Test prolifération	Test prolifération souche 3D7	Test prolifération érythroblastes K562
	Glyphosate		contrôle d'un herbicide sans effet sur parasite	pas d'inhibition dans la gamme	25 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme
	Chloroquine		contrôle d'un antipaludique	nd	nd	nd	nd	0.0103 µM	10.1 µM
	Artésunate		contrôle d'un antipaludique	nd	nd	nd	nd	0.0097 µM	1.06 µM
	Artémisinine		contrôle d'un antipaludique	nd	nd	nd	nd	0.0287 µM	100 µM
	Triclosan		contrôle d'un herbicide antiparasitaire	pas d'inhibition dans la gamme	10 µM	1.2 µM	0.320 µM	1.55 µM	13.4 µM
	A1B1C1_1	498.62	C30H34N4O3	45 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	14 µM	4.9 µM	9.7 µM
	A1B1C2_1	574.71	C36H38N4O3	10 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	4.8 µM	1.4 µM	9.3 µM
	A1B1C3_1	484.59	C29H32N4O3	15 µM	25 µM	15 µM	7.5 µM	6.9 µM	5.7 µM
	A1B1C4_1	498.62	C30H34N4O3	45 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	2.5 µM	3.6 µM	3.6 µM
	A1B1C5_1	408.49	C23H28N4O3	> 100 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	2 µM	> 28 µM	26 µM
	A1B2C1_1	496.6	C30H32N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			3.5 µM	4.1 µM	4.6 µM
	A0B1C1_1	366.5	C23H30N2O2	pas d'inhibition dans la gamme			15 µM	8 µM	38 µM
	A2B1C1_1	456.62	C30H36N2O2	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	4.3 µM	200 µM
	A1B1C8_0	287.4	C17H25N3O	pas d'inhibition dans la gamme			3 µM	>> 28 µM	194 µM
	A1B1C7_0	259.35	C15H21N3O	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	>> 28 µM	195 µM

	A1B1C9_0	427.67	C27H45N3O	pas d'inhibition dans la gamme			1.5 µM avec cristaux visibles au microscope	11 µM	200 µM
	A1B1C0_0	217.27	C12H15N3O	légère activation	pas d'inhibition dans la gamme		activation	>> 28 µM	210 µM
	A1B1C6_1	395.45	C22H25N3O4	pas d'inhibition dans la gamme			0.5 µM	> 28 µM	10.3 µM
	A6B1C1_1	514.68	C30H34N4O2S	> 100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	3.5 µM	1.06 µM	5.3 µM
	A13B1C1_1	569.69	C34H39N3O5	> 100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	5.2 µM	2.14 µM	113.7 µM
	A9B1C1_1	482.62	C30H34N4O2	> 100 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	8 µM	1.81 µM	17 µM
	A4B1C1_1	512.64	C31H36N4O3	> 100 µM	200 µM *	pas d'inhibition dans la gamme	2.5 µM	6.16 µM	93.3 µM
	A3B1C1_1	598.73	C35H42N4O5	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	2 µM	0.785 µM	394.6 µM
	A1B1C4_0	454.61	C29H34N4O	pas d'inhibition dans la gamme			0.8 µM	1.27 µM	24.2 µM
	A7B1C1_1	512.64	C31H36N4O3	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	0.2 µM	1.54 µM	55 µM
	A1B1C3_0	440.58	C28H32N4O	pas d'inhibition dans la gamme			2 µM	1.57 µM	32.1 µM
	A5B3C1_1	512.64	C31H36N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			1 µM	3.76 µM	22.4 µM
	A10B1C1_1	483.6	C29H33N5O2	pas d'inhibition dans la gamme			4 µM	5.95 µM	90.9 µM
	A1B1C2_0	530.7	C35H38N4O	pas d'inhibition dans la gamme			4 µM	2.11 µM	59.6 µM

	A1B1C1_0	454.61	C29H34N4O	pas d'inhibition dans la gamme			7 µM	3.34 µM	33.0 µM
	A5B3C0_0	231.29	C13H17N3O	pas d'inhibition dans la gamme			0.5 µM	15.9 µM	97.2 µM
	A8B1C1_1	499.6	C30H33N3O4	pas d'inhibition dans la gamme			0.8 µM	14.8 µM	151.6 µM
	A1B1C3_2	500.65	C29H32N4O2S	20 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	0.181 µM	2.84 µM	88.3 µM
	A16B7C1_1	495.61	C31H33N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			1.36 µM	3.12 µM	280 µM
	A1B1C6_2	411.52	C22H25N3O3S	> 100 µM	200 µM	> 50 µM	1.13 µM	23.2 µM	54.6 µM
	A1B1C1_2	514.68	C30H34N4O2S	pas d'inhibition dans la gamme			1.18 µM	2.95 µM	56.6 µM
	A1B5C1_1	512.64	C31H36N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			3.41 µM	5.79 µM	34.2 µM
	A15B1C1_1	550.61	C31H33F3N4O2	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	2 µM	0.83 µM	41.4 µM
	A1B6C1_1	472.58	C28H32N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			0.381 µM	16.6 µM	34.7 µM
	A14B1C1_1	499.6	C29H33N5O3	> 100 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	2.5 µM	3.84 µM	15.6 µM
	A1B1C10_1	434.53	C25H30N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			0.450 µM	25.9 µM	98.5 µM
	A1B4C1_1	498.62	C30H34N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			2.35 µM	2.81 µM	18 µM
	A0B0C1_0	255.35	C17H21NO	pas d'inhibition dans la gamme			1.1 µM	>> 28 µM	206 µM

	A0B0C2_0	331.45	C23H25NO	pas d'inhibition dans la gamme			1.77 µM	35.1 µM	48.6 µM
	A17B1C1_1	497.63	C31H35N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			5.57 µM	3.87 µM	28.9 µM
	A18B1C1_1	588.74	C37H40N4O3	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme		1.76 µM	0.77 µM	94.4 µM
	A19B1C1_1	594.79	C37H46N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			1.57 µM	1.03 µM	327 µM
	A20B1C1_1	576.71	C31H36N4O5S	pas d'inhibition dans la gamme			1.98 µM	1.60 µM	101 µM
	A25B1C1_1	481.63	C31H35N3O2	pas d'inhibition dans la gamme			0.248 µM	3.14 µM	90.5 µM
	A26B1C1_1	496.64	C31H36N4O2	pas d'inhibition dans la gamme			3.41 µM	2.42 µM	14.3 µM
	A1B8C1_1	570.68	C33H38N4O5	pas d'inhibition dans la gamme			2.81 µM	1.52 µM	20.8 µM
	A21B1C1_1	638.78	C36H38N4O5S	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	1.68 µM	0.23 µM	248 µM
	A22B1C1_1	602.72	C37H38N4O4	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	0.96 µM	2.88 µM	138 µM
	A23B1C1_1	540.65	C32H36N4O4	pas d'inhibition dans la gamme			0.99 µM	2.94 µM	169 µM
	A24B1C1_1	483.64	C31H37N3O2	pas d'inhibition dans la gamme			1.98 µM	2.83 µM	144 µM
	A27B1C1_1	533.06	C30H33CIN4O3	pas d'inhibition dans la gamme			1 µM	4.68 µM	1.38 µM

	A28B1C1_1	497.67	C32H39N3O2	pas d'inhibition dans la gamme			25 µM	2.81 µM	7.01 µM
	A1B9C1_1	512.64	C31H36N4O3	> 100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	5 µM	10.7 µM	1.44 µM
	A1B1C11_1	360.45	C19H28N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			12 µM	> 25 µM	2.71 µM
	A12B1C1_1	582.32	C35H42N4O4	pas d'inhibition dans la gamme			2.80 µM	> 25 µM	2.13 µM
	A1B1C17_1	482.57	C29H30N4O3	> 100 µM	25 µM	10 µM	2 µM	2.93 µM	2.04 µM
	A1B1C18_1	380.44	C21H24N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			9 µM	25 µM	0.80 µM
	A1B1C19_1	388.5	C21H32N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			27 µM	> 25 µM	1.95 µM
	A1B1C12_1	434.44	C23H22N4O5	45 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	26 µM	> 25 µM	2.13 µM
	A1B1C13_1	462.58	C27H34N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			0.98 µM	8.16 µM	4.08 µM
	A1B1C14_1	408.49	C23H28N4O3	> 100 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	1.8 µM	24.4 µM	1.55 µM
	A1B1C16_1	434.53	C25H30N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			5 µM	18.8 µM	2.39 µM
	A1B1C20_1	332.4	C17H24N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			4 µM	> 25 µM	1.83 µM
	A1B1C21_1	455.55	C28H29N3O3	45 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	1.2 µM	8.54 µM	1.12 µM

	A1B1C22_1	681.78	C37H43N7O6	> 100 µM	25 µM	15 µM	1.01 µM	1.27 µM	3.60 µM
	A1B10C1_1	484.59	C29H32N4O3	50 µM	25 µM	> 100 µM	3.3 µM	7.18 µM	19.2 µM
	A1B11C1_1	524.65	C32H36N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			7.0 µM	2.61 µM	11.8 µM
	A1B13C1_1	498.62	C30H34N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			3.1 µM	7.27 µM	16.0 µM
	A1B12C1_1	526.67	C32H38N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			4.2 µM	6.84 µM	12.8 µM
	A29B1C1_1	548.67	C34H36N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			0.75 µM	7.20 µM	20.5 µM
	A30B1C1_1	481.63	C31H35N3O2	pas d'inhibition dans la gamme			1.85 µM	5.21 µM	82.3 µM
	A31B1C1_1	513.67	C32H39N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			1.3 µM	7.20 µM	14.4 µM
	A1B1C23_3	654.8	C40H42N6O3	pas d'inhibition dans la gamme			1.2 µM	7.04 µM	4.18 µM
	A1B1C24_3	482.62	C30H34N4O2	25 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	6.3 µM	11.3 µM	15.4 µM
	A7B14C25_0	319.36	C18H17N5O	pas d'inhibition dans la gamme		> 100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	101.0 µM
	A32B1C1_1	574.71	C36H38N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			3.5 µM	2.29 µM	207 µM
	A33B1C1_1	499.64	C31H37N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			4.9 µM	25.4 µM	14.4 µM

	A1B1C26_0	468.63	C30H36N4O	pas d'inhibition dans la gamme			1.5 µM	2.95 µM	3.16 µM
	A7B1C2_1	588.74	C37H40N4O3	75 µM	pas d'inhibition dans la gamme	45 µM	0.800 µM	0.452 µM	25.3 µM
	A21B1C2_1	714.87	C42H42N4O5S	pas d'inhibition dans la gamme			22 µM	1.94 µM	243 µM
	A37B3C29_0	292.38405	C19H20N2O	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	129 µM
	A1B1C1_4	497.64575	C30H35N5O2	pas d'inhibition dans la gamme			15 µM	3.47 µM	12.4 µM
	A1B1C1_5	513.71035	C30H35N5OS	50 µM	100 µM	>> 50 µM	7.5 µM	2.71 µM	9.44 µM
	A1B1C1_3	496.65817	C31H36N4O2	pas d'inhibition dans la gamme			10.5 µM	4 µM	13.0 µM
	A11B1C1_1	497.6429	C31H35N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			11 µM	3.64 µM	22.6 µM
	A34B1C1_1	612.77588	C36H44N4O5	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	5.7 µM	0.60 µM	20.00 µM
	A35B1C1_1	584.7217	C34H40N4O5	pas d'inhibition dans la gamme			1.7 µM	6.29 µM	26.0 µM
	A36B1C1_1	566.70636	C34H38N4O4	pas d'inhibition dans la gamme			11.5 µM	3.12 µM	4.69 µM
	A1B1C15_1	441.53454	C27H27N3O3	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	12 µM	8.33 µM	11.9 µM
	A1B15C27_1	288.3494	C16H20N2O3	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	86.9 µM

	A1B16C28_1	268.27449	C15H12N2O3	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	95.6 µM
	A0B17C1_4	534.75119	C35H42N4O	pas d'inhibition dans la gamme			9.2 µM	1.32 µM	16.2 µM
	A38B1C1_1	641.81764	C37H47N5O5	pas d'inhibition dans la gamme			3 µM	1.42 µM	9.5 µM
	A38B1C2_1	717.91642	C43H51N5O5	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	3.2 µM	0.384 µM	15.2 µM
	A40B1C1_1	504.6783	C30H40N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			2.6 µM	2.85 µM	11.9 µM
	A39B1C1_1	504.6783	C30H40N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			17 µM	3.33 µM	9.20 µM
	A41B1C2_1	844.09739		pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	50-100 µM	2.6 µM	0.48 µM	8.35 µM
	A42B1C1_1	680.87333		pas d'inhibition dans la gamme			5.5 µM	9.1 µM	157 µM
	A43B1C1_1	656.78249		pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	1.5 µM	0.33 µM	107 µM
	A44B1C1_1	668.81855		pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	1.75 µM	0.41 µM	162 µM
	A45B1C1_1	706.79044		pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	8.5 µM	0.42 µM	298 µM
	A46B1C1_1	644.81782		pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	3.8 µM	0.47 µM	141 µM
	A47B1C1_1	689.84018		pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	0.78 µM	177 µM
	A48B1C1_1	688.8526		pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	2.3 µM	0.95 µM	143 µM

	A50B1C1_1	779.00338	C48H54N6O4	pas d'inhibition dans la gamme			9 µM	2.62 µM	30.3 µM
	A51B1C1_1	497.64575	C30H35N5O2	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	0.98 µM	0.190 µM	13.3 µM
	A0B19C1_1	536.72065	C35H40N2O3	pas d'inhibition dans la gamme			12 µM	1.64 µM	153 µM
	A52B18C1_1	546.67508	C34H34N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			6 µM	3.26 µM	172 µM
	A53B1C1_1	457.6212	C29H35N3O2	pas d'inhibition dans la gamme			9.5 µM	3.41 µM	177 µM
	A54B1C1_1	487.64769	C30H37N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			10 µM	8.42 µM	157 µM
	A55B1C1_1	517.67418	C31H39N3O4	pas d'inhibition dans la gamme			7.3 µM	2.38 µM	105 µM
	A56B1C1_1	547.70067	C32H41N3O5	pas d'inhibition dans la gamme			16 µM	3.09 µM	16.2 µM
	A57B1C1_1	583.51763	C29H34IN3O2	pas d'inhibition dans la gamme			7.65 µM	8.09 µM	153 µM
	A49B3C1_1	483.61581	C30H33N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			7.5 µM	3.86 µM	13.2 µM
	A1B1C30_1	543.62801	C30H33N5O5	20 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	3.33 µM	3.04 µM	4.17 µM
	A7B14C31_0	495.58903	C28H29N7O2	pas d'inhibition dans la gamme			14.8 µM	24.5 µM	23 µM
	A7B14C3_0	438.53672	C26H26N6O	pas d'inhibition dans la gamme			50 µM	10.8 µM	3.63 µM
	A58B1C1_1	695.84437	C38H41N5O6S	pas d'inhibition dans la gamme			3 µM	1.54 µM	114 µM
	A18B1C2_1	664.85513	C43H44N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			3.6 µM	0.953 µM	90.8 µM
	A7B14C32_0	452,56	C27H28N6O	pas d'inhibition dans la gamme			7.5 µM	7.56 µM	4.37 µM

	A18B1C33_1	701,32	C43H45ClN4O3	pas d'inhibition dans la gamme			1.8 µM	0.873 µM	167 µM
	A1B1C1_6	496,66	C30H36N6O	pas d'inhibition dans la gamme			11 µM	0.511 µM	23.2 µM
	A1B18C1_1	506,61	C31H30N4O3	45 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	5 µM	7.92 µM	10.8 µM
	A62B1C1_1	576,74	C36H40N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			2.7 µM	4.12 µM	100 µM
	A63B1C1_1	561,73	C36H39N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			2.7 µM	1.46 µM	24.6 µM
	A64B1C1_1	597,78	C35H39N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			1.75 µM	0.525 µM	138 µM
	A59B1C1_1	475,61	C29H34FN3O2	pas d'inhibition dans la gamme			5.5 µM	6.74 µM	103 µM
	A60B1C1_1	526,51	C29H33Cl2N3O2	pas d'inhibition dans la gamme			3.75 µM	7.25 µM	146 µM
	A61B1C1_1	472,64	C29H36N4O2	pas d'inhibition dans la gamme			12.9 µM	10.3 µM	28.7 µM
	A65B1C1_1	526,64	C31H34N4O4	> 100 µM			1.7 µM	6.97 µM	21.3 µM
	A66B1C1_1	558,73	C36H38N4O2	pas d'inhibition dans la gamme			3.75 µM	2.33 µM	58.7 µM
	A67B1C1_1	497,65	C30H35N5O2	> 100 µM		pas d'inhibition dans la gamme	3.8 µM	36.5 µM	79.9 µM
	A68B1C1_1	639,86	C38H45N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			6.9 µM	1.59 µM	268 µM
	A69B1C1_1	615,77	C35H38FN3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			0.8 µM	0.617 µM	334 µM
	A70B1C1_1	627,81	C36H41N3O5S	pas d'inhibition dans la gamme			4.0 µM	0.783 µM	280 µM

	A71B1C1_1	665,78	C36H38F3N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			5.5 µM	0.355 µM	204 µM
	A72B1C1_1	603,81	C33H37N3O4S2	pas d'inhibition dans la gamme			1.0 µM	0.861 µM	78.6 µM
	A73B1C1_1	648,83	C38H40N4O4S	pas d'inhibition dans la gamme			2.7 µM	1.06 µM	87.7 µM
	A74B1C1_1	647,84	C39H41N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			6 µM	0.290 µM	202 µM
	A1B1C34_1	546,68	C34H34N4O3	> 100 µM			2.3 µM	3.01 µM	3.41 µM
	A1B1C35_1	532,65	C33H32N4O3	> 100 µM			1.3 µM	8.48 µM	111 µM
	A75B1C1_1	541,74	C34H43N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			3.7 µM	2.96 µM	179 µM
	A76B1C1_1	498,63	C30H34N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			3.25 µM	7.00 µM	20.6 µM
	A1B1C36_1	540,71	C33H40N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			2.0 µM	2.72 µM	17.6 µM
	A1B1C37_1	526,68	C32H38N4O3	8 µM		pas d'inhibition dans la gamme	7 µM	2.81 µM	28.3 µM
	A1B1C38_1	540,71	C33H40N4O3	12 µM		pas d'inhibition dans la gamme	3.75 µM	2.61 µM	24.6
	A1B1C39_1	448,57	C26H32N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			20 µM	25.4 µM	25.7 µM
	A1B1C40_1	540,71	C33H40N4O3	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	8 µM	2.4 µM	12.0 µM
	A1B1C41_1	512,66	C31H36N4O3	35 µM	25 µM	5 µM	3.6 µM	1.48 µM	13.2 µM
	A1B1C42_1	512,66	C31H36N4O3	50 µM	100 µM	20 µM	5.1 µM	2.28 µM	10.4 µM

	A1B1C43_1	560,7	C35H36N4O3	40 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	3.75 µM	0.5 µM	35.8 µM
	A1B1C44_1	773,02	C49H48N4O3S	8 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	17.5 µM	7.38 µM	140 µM
	A1B1C45_1	351,41	C20H21N3O3	pas d'inhibition dans la gamme			0.3 µM	77.2 µM	11.0 µM
	A1B1C46_1	448,57	C26H32N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			5 µM	6.39 µM	90.5 µM
	A1B1C47_1	470,58	C28H30N4O3	40 µM	200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	7.5 µM	6.22 µM	12.0 µM
	A1B1C48_1	538,7	C33H38N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			2 µM	2.20 µM	16.8 µM
	A77B1C1_1	597,78	C35H39N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			39 µM	1.26 µM	36.0 µM
	A78B1C1_1	487,67	C29H33N3O2S	pas d'inhibition dans la gamme			9.5 µM	4.45 µM	60.8 µM
	A79B1C1_1	592,81	C36H40N4O2S	pas d'inhibition dans la gamme			3.0 µM	1.25 µM	44.2 µM
	A80B1C1_1	528,7	C32H40N4O3	pas d'inhibition dans la gamme			6.25	5.26 µM	25.2 µM
	A81B1C1_1	471,65	C30H37N3O2	pas d'inhibition dans la gamme			12 µM	3.69 µM	133 µM
	A1B1C49_1	580,09	C30H34ClN5O5	50 µM	200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	9 µM	2.45 µM	3.44 µM
	A1B1C50_1	580,09	C30H34ClN5O5	15 µM	env. 100 µM, en validation	en cours d'analyse	3.3 µM	3.17 µM	10.3 µM

	A1B1C51_1	565,12	C31H37CIN4O4	60 µM	env. 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme	6.6 µM	>10 µM	18.0 µM
	A1B1C52_1	599,96	C29H32BrCIN4O3	15 µM	env. 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme	3.2 µM	4.41 µM	17.5 µM
	A1B1C53_1	613,99	C30H34BrCIN4O3	50 µM	200 µM	5 µM; très intéressant car totalement létal à 50 µM	11.5 µM	2.88 µM	13.8 µM
	A1B1C54_1	565,12	C31H37CIN4O4	50 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	5.5 µM	1.87 µM	14.9 µM
	A53B1C2_1	533,72	C35H39N3O2	pas d'inhibition dans la gamme			3.8 µM	0.922 µM	159 µM
	A82B1C1_1	611,81	C36H41N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			3.9 µM	0.338 µM	99 µM
	A83B1C1_1	611,81	C36H41N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			2.9 µM	0.483 µM	90.9 µM
	A84B1C1_1	665,78	C36H38F3N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			3.2 µM	0.553 µM	113 µM
	A85B1C1_1	673,88	C41H43N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			6.2 µM	2.2 µM	72.5 µM
	A86B1C1_1	647,84	C39H41N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			13.2 µM	4.43 µM	152 µM
	A87B1C1_1	690,91	C41H46N4O4S	pas d'inhibition dans la gamme			0.212 µM	0.314 µM	74.2 µM
	A1B1C56_1	574,73	C36H38N4O3	6 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	2.9 µM	1.49 µM	29.9 µM
	A27B1C0_0	251,72	C12H14CIN3O	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	124 µM
	A1B1C55_1	485,59	C28H31N5O3	45 µM	100 µM	10 µM; très intéressant car totalement létal à 50 µM	18.8 µM	12.5 µM	38.4 µM
	A1B1C57_1	539,05	C29H32CIFN4O3	5 µM	50 µM	>> 50 µM	1.4 µM	3.57 µM	6.71 µM

	A1B1C58_1	549,12	C31H37CIN4O3	15 µM	50 µM	> 50 µM	1.7 µM	3.61 µM	13.4 µM
	A1B1C59_1	551,09	C30H35CIN4O4	15 µM	50 µM	> 50 µM	5 µM	3.49 µM	12.3 µM
	A1B1C60_1	551,09	C30H35CIN4O4	15 µM	25 µM	> 50 µM	1.75 µM	3.72 µM	6.62 µM
	A1B1C61_1	613,16	C35H37CIN4O4	8 µM	150 µM	pas d'inhibition dans la gamme	3.7 µM	1.42 µM	11.6 µM
	A1B1C62_1	555,51	C29H32CI2N4O3	8 µM	150 µM	pas d'inhibition dans la gamme	5.3 µM	3.31 µM	8.31 µM
	A71B1C2_1	741,88	C42H42F3N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			3.1 µM	1.56 µM	143 µM
	A74B1C2_1	723,94	C45H45N3O4S	pas d'inhibition dans la gamme			5.5 µM	1.33 µM	32.9 µM
	A70B1C2_1	703,91	C42H45N3O5S	pas d'inhibition dans la gamme			6.3 µM	0.828 µM	83.5 µM
	A1B1C63_1	553,08	C30H34CIFN4O3	40 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	3.3 µM	5.94 µM	11.0 µM
	A1B1C64_1	563,15	C32H39CIN4O3	60 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	4.0 µM	4.2 µM	13.7 µM
	A1B1C72_1	586,14	C33H36CIN5O3	60 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	1.0 µM	2.55 µM	4.26 µM
	A1B1C65_1	565,12	C31H37CIN4O4	25 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	3.75 µM	3.98 µM	17.0 µM
	A1B1C66_1	627,19	C36H39CIN4O4	40 µM	>200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	5.2 µM	2.67 µM	10.6 µM
	A1B1C67_1	569,54	C30H34CI2N4O3	15 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	5 µM	2.06 µM	10.4 µM

	A1B1C68_1	569,54	C30H34Cl2N4O3	60 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	7.6 µM	3.63 µM	10.9 µM
	A1B1C69_1	571,12	C33H35ClN4O3	75 µM	>200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	7.2 µM	3.87 µM	11.3 µM
	A1B1C70_1	572,11	C32H34ClN5O3	75 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	1.05 µM	2.95 µM	1.39 µM
	A1B1C71_1	574,13	C32H36ClN5O3	100 µM	200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	1.2 µM	4.2 µM	22.4 µM
	A1B1C73_1	536,07903	C29H34ClN5O3	17 µM	50 µM	20 µM	7 µM	1.29 µM	11.7 µM
	A1B1C74_1	536,07903	C29H34ClN5O3	15 µM	50 µM	50 µM	2.3 µM	3.6 µM	17.6 µM
	A1B1C75_1	641,21672	C37H41ClN4O4	12 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	0.8 µM	1.60 µM	14.3 µM
	A1B1C76_1	635,21253	C38H39ClN4O3	25 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	0.7 µM	1.61 µM	33.8 µM
	A1B1C78_1	585,15199	C34H37ClN4O3	25 µM		pas d'inhibition dans la gamme	3.75 µM	2.55 µM	5.98 µM
	A1B1C79_1	541,11721	C28H33ClN4O3S	30 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	5 µM	3.41 µM	10.3 µM
	A1B1C80_1	536,07903	C29H34ClN5O3	35 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	1.8 µM	3.86 µM	11.5 µM
	A1B1C82_1	494,59583	C27H34N4O5	12 µM	25 µM	30 µM	2 µM	5.87 µM	8.78 µM
	A1B1C83_1	455,49484	C23H27N4O6	pas d'inhibition dans la gamme			17.5 µM	12.3 µM	60.9 µM
	A1B1C84_1	725,91734	C39H47N7O5S	pas d'inhibition dans la gamme			11.5 µM	2.13 µM	15.1 µM

	A1B1C81_1	541,11721	C28H33CIN4O3S	50 µM	< 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme	4 µM	4.17 µM	14.9 µM
	A1B1C91_1	553,08	C30H34CIN4O3	12 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	5.3 µM	2.22 µM	8.28 µM
	A1B1C92_1	563,15	C32H39CIN4O3	100 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	6 µM	4.61 µM	40.5 µM
	A1B1C93_1	565,12	C31H37CIN4O4	80 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	3.5 µM	0.588 µM	3.96 µM
	A1B1C85_1	569,54	C30H34CIN4O3	30 µM	< 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme	1.2 µM	2.92 µM	14.5 µM
	A1B1C86_1	579,15	C32H39CIN4O4	80 µM		pas d'inhibition dans la gamme	7 µM	4.27 µM	15.1 µM
	A1B1C87_1	585,15	C34H37CIN4O3	60 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	2.7 µM	3.24 µM	>3.4 µM
	A1B1C88_1	586,14	C33H36CIN5O3	50 µM		pas d'inhibition dans la gamme	3.3 µM	0.731 µM	>1.7 µM
	A1B1C89_1	588,16	C33H38CIN5O3	50 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	4.8 µM	>8.3 µM	29.5 µM
	A1B1C90_1	627,19	C36H39CIN4O4	15 µM	~200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	1.5 µM	1.96 µM	6.94 µM
	A1B1C94_1	542,64	C31H34N4O5	pas d'inhibition dans la gamme			2.2 µM	8.3 µM	63.7 µM
	A1B1C95_1	527,67	C31H37N5O3	pas d'inhibition dans la gamme			10.5 µM	8.3 µM	52.5 µM
	A1B1C96_1	519,05	C29H31CIN4O3	8 µM	175 µM	pas d'inhibition dans la gamme	1.5 µM	2.59 µM	12.7 µM
	A1B1C98_1	488,59	C28H32N4O4	pas d'inhibition dans la gamme			10.2 µM	8.62 µM	46.9 µM

	A1B1C99_1	499,62	C29H33N5O3	pas d'inhibition dans la gamme	
	A1B1C97_1	514,63	C30H34N4O4	10 µM	<100 µM
	A1B1C100_1	535,65	C32H33N5O3	pas d'inhibition dans la gamme	
	A1B1C101_1	590,73	C36H38N4O4	20 µM	150 µM
	A1B1C102_1	590,73	C36H38N4O4	30 µM	pas d'inhibition dans la gamme
	A1B1C103_1	520,58	C29H30F2N4O3	8 µM	100 µM
	A1B1C104_1	488,59	C28H32N4O4	25 µM	150 µM
	A1B1C105_1	488,59	C28H32N4O4	> 100 µM	150 µM
	A1B1C106_1	488,59	C28H32N4O4	50 µM	100 µM
	A1B1C107_1	590,73	C36H38N4O4	8 µM	pas d'inhibition dans la gamme
	A1B1C108_1	510,64	C31H34N4O3	50 µM	< 100 µM

25 µM	8.3 µM	41.8 µM
6.5 µM	4.66 µM*	7.46 µM
30 µM	>8.3 µM*	38.3 µM
3.5 µM	0.842 µM	5.84 µM
7 µM	3.15 µM*	29.6 µM
5.5 µM	5.37 µM*	10.7 µM
11 µM	7.47 µM*	14.1 µM
15 µM	>4.2 µM*	12.5 µM
13 µM	5.08 µM	20.1 µM
6.5 µM	3.57 µM	16.4 µM
7.5 µM	4.97 µM	22.4 µM

	A1B1C109_1	556,67	C32H36N4O5	> 100 µM	200 µM
	A1B1C110_1	533,08	C30H33CIN4O3	12 µM	< 100 µM
	A1B1C111_1	598,75	C38H38N4O3	pas d'inhibition dans la gamme	
	A1B1C112_1	541,70	C32H39N5O3		
	A1B1C113_1	604,76	C37H40N4O4	45 µM	>200 µM
	A1B1C114_1	550,70	C31H42N4O5	10 µM	pas d'inhibition dans la gamme
	A1B1C115_1	584,72	C34H40N4O5	5 µM	
	A1B1C116_1	450,59	C26H34N4O3	45 µM	>> 200 µM
	A1B1C117_1	484,60	C29H32N4O3	60 µM	150 µM
	A88B1C1_1	485,68	C31H39N3O2	pas d'inhibition dans la gamme	
	A89B1C1_1	646,90	C37H50N4O4S		

16 µM	7.56 µM	4.41 µM
8 µM	6.18 µM	12.7 µM
12 µM	18.9 µM	15.7 µM
15 µM	7.92 µm	39.5 µM
3 µM	7.05 µM	24.3 µM
2.2 µM	1.42 µM	10.7 µM
6.2 µM	0.828 µM	4.57 µM
2.3 µM	12.8 µM	36.8 µM
0.8 µM	15.8 µM	15.1 µM
	8.16 µM	> 93 µM
	pas d'inhibition dans la gamme	28.3 µM

	A90B1C1_1	600,23	C35H38CIN3O2S	pas d'inhibition dans la gamme				2.58 µM	40.8 µM
	A91B1C119_0 (Astemizole)	458,58	C28H31FN4O	pas d'inhibition dans la gamme				0.294 µM	0.536 µM
	A1B1C118_1	646,91	C39H46N4O3Si	35 µM	200 µM			7.72 µM	5.21 µM
	A92B1C1_1	561,77	C37H43N3O2	pas d'inhibition dans la gamme				0.913 µM	>93 µM
	A93B1C1_1	589,83	C39H47N3O2	pas d'inhibition dans la gamme				2.60 µM	>93 µM
	A94B1C1_1	676,33	C41H42CIN3O2S	pas d'inhibition dans la gamme				pas d'inhibition dans la gamme	>93 µM
	A95B1C1_1	579,81	C36H41N3O2S	pas d'inhibition dans la gamme				2.65 µM	>93 µM
	A1B1C120_1	556,71	C33H40N4O4	40 µM	100 µM			8.3 µM	4.75 µM

ANNEXE Tableau 2 : Analyse par spectrométrie de masse de l'ensemble des polypeptides détectés après fractionnement d'extraits de *Plasmodium falciparum* solubilisés par le triton-X100, par chromatographie d'affinité sur matrice couplée avec un dérivé biotinylé du châssis moléculaire bioactif. Ce tableau recense l'ensemble des polypeptides d'extraits de *Plasmodium falciparum*, solubilisés par le triton-X100, purifiés par chromatographie d'affinité sur matrice couplée avec un dérivé bioactif biotinylé et séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes. Le gel présenté sur la [Figure 57](#), a été découpé sur toute la longueur en 33 bandes et les polypeptides présents ont été analysés par LC-MS/MS suivant la procédure décrite dans le matériel et méthodes. 59 polypeptides ont ainsi été détectés sur la base d'un minimum de 4 peptides tryptiques. Du fait que les inhibiteurs ont été criblés sur l'activité d'une enzyme transférant un sucre d'un donneur nucléotidique, le tableau indique les sites de liaison à des nucléotides et à des lipides comme potentiellement impliqués dans la fixation à la matrice d'affinité. Pour se qui concerne l'inhibition de la MGDG synthase de plante, les inhibiteurs sont des compétiteurs du diacylglycérol, suivant une superposition avec le squelette glycérol de ce lipide : les sites de liaison à des petites molécules tricarbonées (glycéron-P, glyceraldehyde-3-P, lactate, pyruvate), sont donc indiqués comme des zones potentiellement impliquées dans la liaison à la matrice d'affinité.

description	accesion	organisme	score	masse	couverture	Nombre de pept. trypt.	Liaison des nucléotides	Liaison à des lipides	Liaison à des petites molécules tricarbonées	Domaine TM	Compartment
Polypeptides dont les séquences correspondent à des protéines de <i>Plasmodium falciparum</i>											
11 à 20 peptides tryptiques											
2 High molecular weight rhoptry protein-2 - <i>P. falciparum</i>	Q8I060	PLAFA	862,45	162561	15,64	20					Sp ; Rhop
Endoplasmic homolog, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I0V4	PLAF7	1320,46	94959	26,54	19	ATP				Sp ; ER
Heat shock protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I2X4	PLAF7	1073,30	72343	32,88	19	ATP				Sp ; ER
Merozoite surface protein 1, - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I0U8	PLAF7	872,86	195605	9,96	17		?		x	Sp ; PM
Elongation factor 1-alpha - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I0P6	PLAF7	916,01	48928	45,05	16	GTP				cytoplasme
Heat shock 70 kDa protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IB24	PLAF7	993,86	73868	28,76	15	ATP				cytoplasme
Putative pyruvate kinase - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q6LF06	PLAF7	997,75	55625	43,96	15	ATP		pyruvate		cytoplasme
QF122 antigen - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IUS7	PLAF7	853,31	131545	14,31	15	KH domain				cytoplasme
Putative uncharacterized protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IIV8	PLAF7	639,74	49235	29,75	13	?	?	?		Sp+Tp ; apicoplaste
Elongation factor 2 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IKW5	PLAF7	602,36	93462	15,67	11	GTP				cytoplasme
6 à 10 peptides tryptiques											
Rhoptry protein, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I395	PLAF7	498,47	104789	11,87	9					Sp ; Rhop
Putative uncharacterized protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I172	PLAF7	433,15	51919	13,16	9					Sp
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I535	PLAF7	517,18	92034	11,84	8	ATP	Acyl-CoA			cytoplasme
Disulfide isomerase, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I6S6	PLAF7	447,18	55466	22,02	8				x	Sp ; ER
Adenylate kinase 2 - <i>P. falciparum</i>	Q7Z0H0	PLAFA	425,39	27594	38,80	8	ATP				cytoplasme
Cytoplasmic linked asexual protein, CLAG - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	O77310	PLAF7	327,72	167135	6,32	8					Sp ; PM cellule hôte
Fructose-bisphosphate aldolase - <i>P. falciparum</i>	ALF	PLAFA	402,88	40080	24,66	7			glycerone-P +		cytoplasme

10	Putative uncharacterized protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IUR2 PLAF7	isolate 3D7	291,88	75420	9,78	7		x	Sp ; membrane
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IKK7 PLAF7	isolate 3D7	420,23	36612	23,19	6	NAD(P)		Mitochondrie
	Plasmeprin, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IM16 PLAF7	isolate 3D7	408,71	51014	13,82	6	?		Membrane ; Food vacuole Mitochondrie
	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IE67 PLAF7	isolate 3D7	372,24	49352	17,86	6	ATP		
	L-lactate dehydrogenase - <i>P. falciparum</i> (isolate CDC / Honduras)	LDH PLAFD	isolate CDC / Honduras	352,08	34086	20,65	6	NAD		Sp+Tp ; apicoplaste
	Putative uncharacterized protein PF11270w - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I2Q0 PLAF7	isolate 3D7	299,14	24683	27,23	6	?		Sp
	Long-chain fatty acid CoA ligase, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I3L4 PLAF7	isolate 3D7	352,47	76803	11,17	6	ATP	Acyl-CoA	cytoplasme
	Plasmeprin / HAP protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IM15 PLAF7	isolate 3D7	325,29	51661	13,01	6			Membrane
	Plasmeprin-1 precursor - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	PLM1 PLAF7	isolate 3D7	310,71	51428	14,35	6			Membrane ; Food vacuole export
	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen - <i>P. falciparum</i>	Q9NB35 PLAFA		306,83	154375	5,13	6		HSP-binding	
12	Rhoptry-associated protein 1 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8ILZ1 PLAF7	isolate 3D7	258,32	89996	8,19	6			Sp ; Rhop
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IKK8 PLAF7	isolate 3D7	277,10	21717	36,04	6		HSP-associated	Sp
	Putative uncharacterized protein PF08_0074 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IAX8 PLAF7	isolate 3D7	267,47	27242	21,46	6	Domaine ALBA GTP		Noyau ?
	GTP-binding nuclear protein Ran - <i>P. falciparum</i>	RAN PLAFA		267,71	24860	33,33	6	ATP		Noyau
	T-complex protein 1, gamma subunit, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I5C4 PLAF7	isolate 3D7	225,65	60624	12,70	6			centrosome
	Plasmeprin-2 precursor - <i>P. falciparum</i>	PLM2 PLAFA		294,68	51457	12,63	5			Membrane ; Food vacuole cytoplasme
	Heat shock protein hsp70 homologue - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8II24 PLAF7	isolate 3D7	343,39	73252	10,98	5	ATP		
	Putative uncharacterized protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IUX3 PLAF7	isolate 3D7	288,21	11969	41,67	5	Domaine ALBA GTP/ATP		Noyau ?
	Putative Rab7 GTPase - <i>P. falciparum</i>	Q9NFG0 PLAFA		274,00	23773	26,85	5			Noyau ?
	Peptide chain release factor subunit 1, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q96203 PLAF7	isolate 3D7	235,98	48034	12,84	5			cytoplasme
12	Chaperone, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q6LFH9 PLAF7	isolate 3D7	250,44	61494	11,09	5	ATP		centrosome
	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IUW4 PLAF7	isolate 3D7	228,59	63071	9,60	5			centrosome
	Putative uncharacterized protein MAL13P1.237 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IDM3 PLAF7	isolate 3D7	236,33	42133	14,10	5	Domaine ALBA		Noyau ?

5 peptides tryptiques

10	Putative uncharacterized protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IUR2 PLAF7	isolate 3D7	291,88	75420	9,78	7		x	Sp ; membrane
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IKK7 PLAF7	isolate 3D7	420,23	36612	23,19	6	NAD(P)		Mitochondrie
	Plasmeprin, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IM16 PLAF7	isolate 3D7	408,71	51014	13,82	6	?		Membrane ; Food vacuole Mitochondrie
	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IE67 PLAF7	isolate 3D7	372,24	49352	17,86	6	ATP		
	L-lactate dehydrogenase - <i>P. falciparum</i> (isolate CDC / Honduras)	LDH PLAFD	isolate CDC / Honduras	352,08	34086	20,65	6	NAD		Sp+Tp ; apicoplaste
	Putative uncharacterized protein PF11270w - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I2Q0 PLAF7	isolate 3D7	299,14	24683	27,23	6	?		Sp
	Long-chain fatty acid CoA ligase, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I3L4 PLAF7	isolate 3D7	352,47	76803	11,17	6	ATP	Acyl-CoA	cytoplasme
	Plasmeprin / HAP protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IM15 PLAF7	isolate 3D7	325,29	51661	13,01	6			Membrane
	Plasmeprin-1 precursor - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	PLM1 PLAF7	isolate 3D7	310,71	51428	14,35	6			Membrane ; Food vacuole export
	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen - <i>P. falciparum</i>	Q9NB35 PLAFA		306,83	154375	5,13	6		HSP-binding	
12	Rhoptry-associated protein 1 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8ILZ1 PLAF7	isolate 3D7	258,32	89996	8,19	6			Sp ; Rhop
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IKK8 PLAF7	isolate 3D7	277,10	21717	36,04	6		HSP-associated	Sp
	Putative uncharacterized protein PF08_0074 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IAX8 PLAF7	isolate 3D7	267,47	27242	21,46	6	Domaine ALBA GTP		Noyau ?
	GTP-binding nuclear protein Ran - <i>P. falciparum</i>	RAN PLAFA		267,71	24860	33,33	6	ATP		Noyau
	T-complex protein 1, gamma subunit, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I5C4 PLAF7	isolate 3D7	225,65	60624	12,70	6			centrosome
	Plasmeprin-2 precursor - <i>P. falciparum</i>	PLM2 PLAFA		294,68	51457	12,63	5			Membrane ; Food vacuole cytoplasme
	Heat shock protein hsp70 homologue - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8II24 PLAF7	isolate 3D7	343,39	73252	10,98	5	ATP		
	Putative uncharacterized protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IUX3 PLAF7	isolate 3D7	288,21	11969	41,67	5	Domaine ALBA GTP/ATP		Noyau ?
	Putative Rab7 GTPase - <i>P. falciparum</i>	Q9NFG0 PLAFA		274,00	23773	26,85	5			Noyau ?
	Peptide chain release factor subunit 1, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q96203 PLAF7	isolate 3D7	235,98	48034	12,84	5			cytoplasme
12	Chaperone, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q6LFH9 PLAF7	isolate 3D7	250,44	61494	11,09	5	ATP		centrosome
	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IUW4 PLAF7	isolate 3D7	228,59	63071	9,60	5			centrosome
	Putative uncharacterized protein MAL13P1.237 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IDM3 PLAF7	isolate 3D7	236,33	42133	14,10	5	Domaine ALBA		Noyau ?

Cysteine protease, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q9TY96	PLAF7	isolate 3D7	218,78	103919	6,57	5		Export ?
4 peptides tryptiques									
eIF4A-like - <i>P. falciparum</i>	Q2PZH3	PLAFA		248,06	45281	10,71	4	ATP	Noyau ?
T-complex protein 1, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q96220	PLAF7	isolate 3D7	230,26	58884	8,60	4	ATP	centrosome
Rhoptry-associated protein 2 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I484	PLAF7	isolate 3D7	224,04	46709	10,61	4		Sp ; Rhop
Thioredoxin-related protein, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IDH5	PLAF7	isolate 3D7	242,62	23972	21,20	4		x Sp ; membrane
Eukaryotic translation initiation factor 3 37,28 kDa subunit, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IBT2	PLAF7	isolate 3D7	236,98	37261	16,57	4		cytoplasme
T-complex protein 1, alpha subunit, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IIL3	PLAF7	isolate 3D7	225,14	60223	8,41	4	ATP	centrosome
Multiprotein bridging factor type 1, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IIB1	PLAF7	isolate 3D7	208,71	15516	29,79	4		Noyau
40S ribosomal protein S7 homologue, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IET7	PLAF7	isolate 3D7	195,25	22467	20,10	4		cytoplasme
Ser/Arg-rich splicing factor, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I468	PLAF7	isolate 3D7	177,62	37677	11,70	4		Noyau ?
Polyadenylate-binding protein - <i>P. falciparum</i>	A1EAA0	PLAFA		201,00	97169	4,87	4		spliceosome ?
RNA-binding protein, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IB66	PLAF7	isolate 3D7	174,76	32421	12,59	4		cytoplasme ?
Putative uncharacterized protein MAL13P1.233 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IDN4	PLAF7	isolate 3D7	196,42	24969	20,35	4	Domaine Alba	Noyau ?
Ribonucleoprotein, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8ILU8	PLAF7	isolate 3D7	196,31	22318	23,27	4		spliceosome ?
Merozoite surface protein 7 - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IDX8	PLAF7	isolate 3D7	191,09	41251	10,13	4		Sp ; export ?
Glutamate dehydrogenase, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8IAM0	PLAF7	isolate 3D7	187,79	160324	3,09	4		cytoplasme
Ribosomal protein family L5, putative - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8ILL3	PLAF7	isolate 3D7	171,39	33977	12,66	4		mitochondrie
ATP-dept. acyl-coa synthetase - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I6Z1	PLAF7	isolate 3D7	168,23	93225	4,84	4	ATP	Sp Acyl-CoA
Putative uncharacterized protein - <i>P. falciparum</i> (isolate 3D7)	Q8I4R5	PLAF7	isolate 3D7	140,74	262988	1,72	4		x Sp+Tp ; apicoplaste

Communications scientifiques

Brevets

Deligny M., **Saïdani N.**, Bonneau A.L., Botté C., Hardre, H., Rousseau B., Vial H., Mercier C., Lopez R. & Maréchal E. Compounds with antiparasitic activity, applications thereof to the treatment of infectious diseases caused by apicomplexans. EU 07290683.7, Déposé par le CEA le 1^{er} juin 2007.

Bonneau A.L., Botté C., Deligny M., **Saïdani N.**, Hardre, H., Rousseau B., Lopez R., & Maréchal E. Use of a compound having a monogalactosyldiacylglycerol synthase inhibitory activity as herbicide or algaecide, herbicide and algaecide compositions. EU 07290684.5, Déposé par le CEA le 1^{er} juin 2007.

Botté C., **Saïdani N.**, Block M., Dubremetz J.-F., Vial H., Cesbron-Delauw M.-F., Mercier C. & Maréchal E. Antigène digalactolipidique exposé à la surface des parasites apicomplexes et ses applications diagnostiques et thérapeutiques (Surface exposure of digalactolipid antigene in apicomplexan parasites and therapeutical and diagnostic applications). FR0700859, Déposé par le CEA le 7 Février 2007.

Wong Y.S., Peuchmaur M., Botté C., **Saïdani N.**, Maréchal E., Vial H. Nouveaux composés polyspiranniques, leur application dans le traitement du paludisme ou de la toxoplasmose et leur procédé de préparation. FR0706929. Déposé par l'Université Joseph Fourier le 3 Oct 2007.

Publications originales dans des revues à comité de lecture

Peuchmaur M, **Saïdani N**, Botté C, Maréchal E, Vial H, and Wong YS. Enhanced Antimalarial Activity of Novel Synthetic Aculeatin Derivatives. *J Med Chem*. 2008 Aug 5; [Epub ahead of print].

Botté C, **Saïdani N**, Mondragon R, Mondragón M, Isaac G, Mui E, McLeod R, Dubremetz JF, Vial H, Welti R, Cesbron-Delauw MF, Mercier C and Maréchal E. Localization and dynamics of plant like digalactolipid in membrane and membrane domains along the life cycle of the apicomplexan parasite, *T. gondii*. *J Lipid Research*. 2008 Apr;49(4):746-62.

Birkholtz LM, Bastien O, Wells G, Grando D, Joubert F, Kasam V, Zimmermann M, Ortet P, Jacq N, **Saïdani N**, Roy S, Hofmann-Apitius M, Breton V, Louw AI, Maréchal E. Integration and mining of malaria molecular, functional and pharmacological data: how far are we from a chemogenomic knowledge space? *Malar J*. 2006 Nov 17;5:110

Revue

Saïdani N, Grando D, Valadié H, Bastien O and Maréchal E. Potential and limits of *in silico* target discovery - Case study of the search for new antimalarial chemotherapeutic targets. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008 Jan 15; [Epub ahead of print].

Chapitres d'ouvrage

Bisanz C., Botté C., **Saïdani N.**, Bastien O., Cesbron-Delauw M.F. et Maréchal. E. Structure, function and biogenesis of the secondary plastid of apicomplexan parasites. *Current Research in Plant Cell Compartments*. 2006. In press.

Communications orales

Workshop Cell Biology and Microscopy. 7-11 Décembre 2005, Altteiningen, Allemagne

Présentation Orale **N.Saïdani**

Saïdani N, Botté C, Dubremetz JF, Vial H et Maréchal E

“Galactolipids biosynthesis as potential anti-malarial target.”

Posters

Workshop Cell Biology and Microscopy. 7-11 Décembre 2005, Altleiningen, Allemagne

Saïdani N, Botté C, Dubremetz JF, Vial H et Maréchal E

"Galactolipids biosynthesis as potential anti-malarial target"

Congrès Malaria 2007. 21-27 Avril 2007, Dakar, Sénégal

Saïdani N., Botté C., Dubremetz J-F, Vial H, and Maréchal E

"Plant-like Galactolipids in *Plasmodium falciparum*"

Molecular Parasitology Meeting 2007 (MPM XVII), Marine Biological Laboratory, 16-20 Septembre 2007, Woods Hole, USA

Saïdani N, Botté C, Bonneau AL, Deligny M, Rousseau B, Dubremetz J-F, Vial H, Lopez R, et Maréchal E

"Screening herbicides targeting plant chloroplast MGDG synthesis to develop new antiplasmodials"

EXPLORATORY STUDY OF GALACTOLIPID BIOSYNTHESIS IN *PLASMODIUM FALCIPARUM*

SUMMARY : Plastids are semi-autonomous organelles that derive from a unique endosymbiotic event between an ancestral eukaryotic cell and a cyanobacteria. The best characterized plastid is the chloroplast from plant cells and green algae. Differing from eukaryotic membrane systems that are naturally phospholipid-rich, plant chloroplasts membranes are composed of >70% galactoglycerolipids (monogalactosyldiacylglycerol, MGDG ; digalactosyldiacylglycerol, DGDG). Their synthesis is catalyzed by galactosyltransferases, namely MGDG synthases (EC 2.4.1.46) and DGDG synthases (EC 2.4.1.241), localized in the organelle limiting envelope membranes. In plant cells, galactolipids are essential to plastid biogenesis as well as for the composition of non-plastidial membranes under specific physiological conditions, such as phosphate deprivation.

Most of the apicomplexan parasites (obligate intracellular protozoan parasites) harbour a non-photosynthetic plastid, containing a circular DNA. This organelle, called the apicoplast, is considered as a relic of an algal plastid, resulting from a secondary endosymbiosis between two eukaryotic cells, with the ingestion of a unicellular red algae by an ancestral protozoan, followed by the disappearance of most of the algal subcellular structures. Interestingly, some apicomplexan nuclear gene products are imported into the apicoplast and involved in typical plant biosynthetic pathways such as FASII fatty acids biosynthesis.

Lipids with chromatographic properties similar to those of MGDG and DGDG, have been detected in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* total extracts, suggesting the existence of a chloroplast-like galactolipid biosynthetic pathway. Using a series of antibodies directed against DGDG, a first aim of this thesis work was to investigate the localization of a chloroplastic digalactolipid-like epitope (DGLE) in *P. falciparum* and to determine its evolution along the parasitic cell cycle. These studies suggest that a DGLE may be associated to endomembrane systems in the cell periphery, particularly the inner membrane system. Transgenic parasites expressing an exogenous plant MGDG synthase have been generated. The remarkable accumulation of both MGDG and DGDG demonstrate that the exogenous plant enzyme is functional, catalyzing the synthesis of MGDG, and that a *P. falciparum* glycosyltransferase is subsequently capable of catalyzing large amounts of DGDG. The possible role of this DGDG-producing glycosyltransferase in the synthesis of the DGLE remains to be demonstrated.

A second aim of this thesis consisted in the evaluation of compounds inhibiting the galactolipid synthesis for a therapeutic purpose. An automated high throughput screening of a 24000 molecule-chemolibrary allowed the identification of inhibitors of *Arabidopsis thaliana* MGDG synthase 1, among which two compounds harbour an inhibiting effect in the 10 μ M range on MGDG synthase activity. We characterized the effect of these molecules as competitors of diacylglycerol binding. An antiparasitic activity was measured *in vitro*. In order to improve 1) the herbicidal effect of the lead compounds, 2) the parasite growth inhibition and to develop new antiplasmodial candidates that could be qualified as herbicidal-drugs, a structure-based diversification of the molecules was conducted. The characterization of 250 analogues allowed the optimization of the molecular selectivity with compounds being active in the 200 nM range.

It cannot be excluded that molecules selected for their ability to inhibit a MGDG synthase activity could exert a distinct effect on a non-related *Plasmodium falciparum* target. We developed an experimental procedure to isolate the protein target(s) of the bioactive compounds by affinity chromatography against a biotinylated analogue, leading to the identification of several proteins by mass spectrometry after trypsin digestion.

The development of drug candidates is a long process from the target validation to the clinical trials. The properties of the novel class of compounds characterized in this thesis work are promising. Future prospects include therefore sustained efforts to improve the antiparasitic properties of this novel class of diacylglycerol competitors.

Key words : *Plasmodium*, MGDG synthase, galactolipids, Apicoplast, antimalarial, DGLE

ETUDE EXPLORATOIRE DE LA SYNTHÈSE DES GALACTOLIPIDES CHEZ *PLASMODIUM FALCIPARUM*

RESUME : Les plastes sont des organites semi-autonomes qui dérivent d'un événement unique d'endosymbiose entre une cyanobactérie et une cellule eucaryote ancestrale. Le plaste le mieux caractérisé est le chloroplaste des cellules de plantes et d'algues vertes. À la différence des systèmes membranaires eucaryotes qui sont en général riches en phospholipides, les membranes des plastes végétaux se composent à plus de 70% de galactoglycérolipides (monogalactosyldiacylglycérol, MGDG ; digalactosyldiacylglycérol, DGDG). Leur synthèse est assurée par des galactosyltransférases, les MGDG synthases (EC 2.4.1.46) et les DGDG synthases (EC 2.4.1.241) localisées dans les membranes de l'enveloppe qui limitent l'organite. Chez les plantes, les galactolipides sont essentiels pour la biogenèse des plastes mais aussi à la synthèse de membranes extraplastidiales sous certaines conditions physiologiques telles qu'en carence de phosphate.

La plupart des parasites Apicomplexes (protozoaires parasites à mode de vie intracellulaire) possèdent une structure plastidiale, non photosynthétique, contenant un ADN circulaire. Cet organite, baptisé apicoplaste, a pour origine phylogénétique une endosymbiose secondaire entre deux eucaryotes, avec ingestion d'une algue rouge unicellulaire par un protozoaire ancestral, suivie d'une disparition de la plupart des structures subcellulaires de l'algue. Des protéines codées par des gènes nucléaires sont importées dans l'apicoplaste et impliquées dans des voies métaboliques typiques des plantes telles que la biosynthèse d'acides gras par le système FASII.

Des lipides aux propriétés chromatographiques proches de celles du MGDG et du DGDG ont pu être détectés dans des extraits de *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*, suggérant l'existence d'une voie de biosynthèse des galactolipides comparable à celle existant dans le chloroplaste. Au moyen d'une série d'anticorps dirigés contre le DGDG, un premier objectif de ce travail de thèse a été de caractériser la localisation d'un épitope de structure proche du digalactolipide chloroplastique (DGLE pour digalactolipid-like epitope) chez *P. falciparum* et déterminer l'évolution de la distribution subcellulaire de cet épitope au cours du cycle cellulaire du parasite. Ces études suggèrent qu'un lipide de structure proche du DGDG est associé à des systèmes membranaires en périphérie de la cellule, en particulier le complexe membranaire interne.

Des parasites transgéniques exprimant une MGDG synthase exogène de plante ont été générés. L'accumulation remarquable à la fois de MGDG et de DGDG chez ces transformants démontre d'une part que l'enzyme de plante est fonctionnelle, catalysant la synthèse de MGDG, et d'autre part qu'une glycosyltransférase de *P. falciparum* est capable ensuite de catalyser de grandes quantités de DGDG. Le rôle possible de cette glycosyltransférase dans la synthèse du DGDG reste à établir.

Un second objectif de cette thèse était d'évaluer le potentiel dans *P. falciparum* de composés inhibant la synthèse des galactolipides de plante dans une visée thérapeutique. Un criblage à haut débit robotisé d'une banque de 24.000 molécules nous a permis d'identifier des inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana*, parmi lesquels deux composés présentent un effet inhibiteur mesuré par une CI50 de l'ordre 10 μ M sur l'activité MGDG synthase. Nous avons pu caractériser l'effet de ces molécules comme compétiteurs de la fixation du diacylglycérol. Une activité inhibitrice de la prolifération de *P. falciparum* a pu être mesurée *in vitro* bien qu'aucune enzyme homologue à la MGDG synthase n'ait pu être identifiée *in silico* sur les banques de données relatives aux Apicomplexes. Une diversification de la structure du châssis moléculaire a été conduite afin d'améliorer 1) l'effet herbicide et 2) l'inhibition de la croissance des parasites et de développer ainsi de nouvelles molécules antipaludiques, qui puissent être qualifiées de médicaments herbicides. L'étude de 250 analogues a permis de progresser de façon substantielle dans le sens d'une meilleure sélectivité avec des composés actifs à 200 nM.

Il n'est pas exclu que les molécules sélectionnées pour leur capacité à inhiber une activité MGDG synthase exercent, chez *P. falciparum*, un effet sur une autre cible. Nous avons conduit une expérience visant à isoler la(les) protéine(s) cible(s) des molécules bioactives par chromatographie d'affinité, puis identifié ces protéines après digestion trypsique par spectrométrie de masse. Une perspective de ce travail consiste à caractériser certaines de ces cibles candidates.

Le développement de candidats-médicaments est un processus long selon le schéma classique, depuis la validation d'une cible jusqu'aux essais cliniques. La nouvelle classe de compétiteurs du diacylglycérol caractérisée dans ce travail de thèse présente des propriétés intéressantes dans une visée thérapeutique, qu'il sera important d'optimiser dans l'avenir.

Mots clés : *Plasmodium*, MGDG synthase, galactolipides, apicoplaste, antipaludique, DGLE